ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

# 台灣農業研究

# JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.62 No.2 2013

## 研究報告

93 異體表達文心蘭 (南西) ζ-Carotene Desaturase 致使轉基因煙草胡蘿蔔素含量增加及葉型改變
李文立、陳福旗

106 不同水旱田農耕生態系統對田間雜草相變動之影響
蕭巧玲、楊純明、何佳勳

126 杏鮑菇廢棄基質在菇類栽培之應用
陳美杏、李瑋崧、吳寬澤、簡宣裕、呂昀陞

137 分子標幟輔助耐鹽水稻之選育
郭素真、郭介煒、林彥蓉、吳永培

157 火鶴花切花低溫貯運寒害生理之研究
黃肇家、黃慧穗、蔡金玉

165 網室甜椒害蟲與害蟎種類之調查及防治藥物之篩選
郝秀花

174 不同貯藏溫度條件對鮮藷品質之影響
利幸貞

184 利用薄膜培養基法檢測褐根病菌分泌之生體外分解酵素
蔡志濃、鄭秀芳、蔡惠玲、黃鴻章、謝文瑞、安寶貞

行政院農業委員會農業試驗所出版

# 《台灣農業研究》編審會

## 總編輯

楊純明／農業試驗所

## 領域主編（按筆劃序）

王強生／中興大學農藝系
申　雍／中興大學土壤環境科學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
呂秀英／農業試驗所
柯文雄／中興大學植物病理學系
侯豐男／中興大學昆蟲學系
郭鴻裕／農業試驗所農業化學組
高景輝／臺灣大學農藝學系
陳世銘／臺灣大學生物產業機電工程系
陳吉仲／中興大學應用經濟系
陳宗禮／中興大學農藝系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
陳福旗／屏東科技大學農園生產系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／臺灣大學園藝暨景觀學系
鄔宏潘／中央研究院植物暨微生物學研究所
曾夢蛟／中興大學園藝系
蔡致榮／農業試驗所
蔡新聲／朝陽科技大學生化科技研究所
歐錫坤／農業試驗所作物組
簡立賢／中興大學應用經濟系
蘇正德／東海大學食品科學系

## 編輯助理

吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳相君／農業試驗所研策小組



# 台灣農業研究

第六十二卷　第二期　　中華民國一〇二年六月三十日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　陳駿季
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://aspers.airiti.com/Aspers/webHome.aspx?jnliid=J0042

編印　Airiti Press Inc.
地址　23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新臺幣一七五元
展售門市　1. 國家書店／ 10485 台北市松江路 209 號 1 樓／電話：(02) 2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場／ 40042 台中市中山路 6 號／電話：(04) 2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(2):93–105 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06202.01

# Ectopic Expression of ζ-Carotene Desaturase Gene from *Oncidium* Gower Ramsey Alters Leaf Morphology and Increases Carotenoid Content in Transgenic Tobacco

Wen-Li Lee[1] and Fure-Chyi Chen[2,*]

## Abstract

Lee, W. L. and F. C. Chen. 2013. Ectopic expression of ζ-carotene desaturase gene from *Oncidium* Gower Ramsey alters leaf morphology and increases carotenoid content in transgenic tobacco. J. Taiwan Agric. Res. 62(2):93–105.

The bright yellow floral color of *Oncidium* Gower Ramsey is due mainly to the accumulation of carotenoids making it an important ornamental orchid in Taiwan. In order to understand the expression pattern of ζ-carotene desaturase gene (*ZDS*), the cDNA encoding *ZDS* was cloned and characterized. The full length of *Oncidium ZDS* cDNA (*OncZDS*) contained 1,986 bp and the 5' and 3' untranslated regions (UTR) were 68 bp and 226 bp, respectively. It had a 1,692 bp open reading frame encoding for a polypeptide of 563 amino acids and shared 72.8–96.2% similarity with other plant species. When analyzing the relative expression level of *OncZDS* in flowers, roots and leaves, the results showed that the expression level of *OncZDS* increased gradually until flowers half opened (stage 5). Furthermore, ectopic expression of *35S::OncZDS* in transgenic tobacco plant resulted in an alteration of leaf morphology and an increase of carotenoid content.

**Key words:** *Oncidium* Gower Ramsey, ζ-carotene desaturase, Cloning, Gene expression, Ectopic expression.

## INTRODUCTION

The flower color of higher plants is mainly composed of three large groups of pigments, betalains, flavonoids and carotenoids. The former two are water-soluble, while carotenoids are lipid-soluble (Grotewold 2006). Anthocyanins belong to the flavonoid group that responsible for the orange, pink, red, purple and blue colors of flowers (He *et al.* 2010). Carotenoids usually accumulate with high concentration in chromoplasts of yellow flowers and display orange, red, bronze and brown colors. Betalains are found in vacuoles in plants of the Cactaceae, Amaranthaceae and Caryophyllales (Christinet 2004) and are a class of yellow, orange, red and purple pigments (To & Wang 2006).

In higher plants, carotenoids are made from $C_5$ isopentenyl diphosphate (IPP) by methylerythritol phosphate (MEP) pathway in plastids. Four molecules of IPP are converted to geranylgeranyl diphosphate (GGPP) by the action of IPP isomerase (IPI) and GGPP synthase (GGPS). The condensation of two molecules of GGPP by phytoene synthase (PSY) gives rise to 15-cis-phytoene, the first dedi-

Received: August 29, 2012; Accepted: April 22, 2013.
* Corresponding author, e-mail: fchen@mail.npust.edu.tw
[1] Associate Research Fellow and Head of Department of Tropical Fruit Trees, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
[2] Professor, Graduate Institute of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, ROC.

cated compound in the carotenoid pathway. Phytoene is converted into lycopene by the action of two desaturases, phytoene desaturase (PDS) and ζ-carotene desaturase (ZDS), and displayed in red color. Lycopene is the branching point for subsequent conversion to other compounds (Sandmann 2001; Hieber *et al.* 2006; Giuliano *et al.* 2008). Lycopene cyclase (LYC) catalyzes lycopene to generate α-carotene and β-carotene, respectively. The former was further converted into lutein, astaxanthin and capsorubin, while the latter was converted into zeaxanthin, violaxanthin and neoxanthin, with abscisic acid (ABA) as the final product (Fig. 1) (Cunningham & Gantt 1998; Josse *et al.* 2000; Eisenreich *et al.* 2001; Hirschberg 2001; Moehs *et al.* 2001; Rodríguez-Concepción & Boronat 2002; Giuliano *et al.* 2008).

The genus *Oncidium* is a terrestrial orchid with over 600 species, and native to Mexico, Brazil and Bolivia (Pridgeon *et al.* 1996). The *Oncidium* orchid has become the most important flowers for

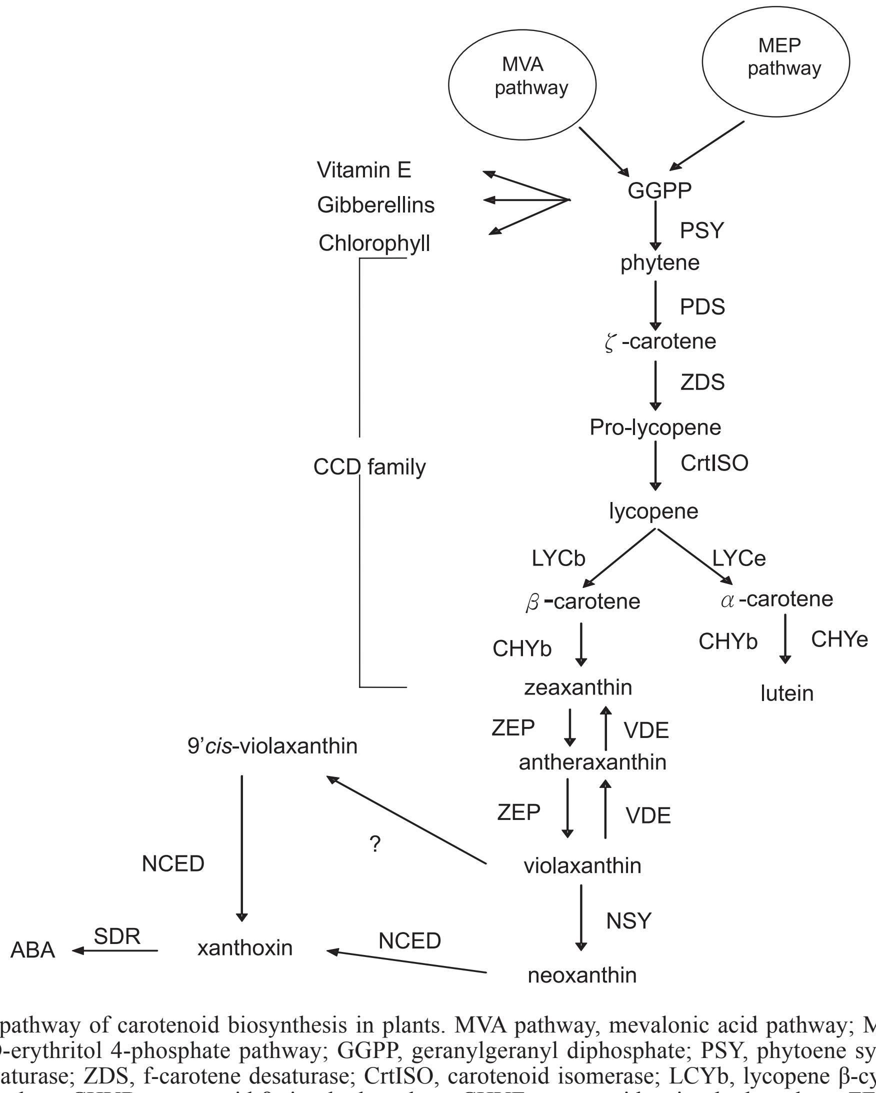


**Fig. 1.** The pathway of carotenoid biosynthesis in plants. MVA pathway, mevalonic acid pathway; MEP pathway, 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway; GGPP, geranylgeranyl diphosphate; PSY, phytoene synthase; PDS, phytoene desaturase; ZDS, f-carotene desaturase; CrtISO, carotenoid isomerase; LCYb, lycopene β-cyclase; LCYe, lycopene ε-cyclase; CHYB, carotenoid β-ring hydroxylase; CHYE, carotenoid ε-ring hydroxylase; ZEP, zeaxanthin epoxidase; VDE, violaxanthin de-epoxidase; NSY, neoxanthin synthase; CCD, carotenoid cleavage dioxygenase; NCED, 9-*cis* epoxycarotenoid dioxygenase; ?, putative violaxanthin isomerase; SDR, short-chain dehydrogenase/reductase; ABA, abscisic acid. Figure compiled and summarized from Cunningham & Gantt (1998), Eisenreich *et al.* (2001), Hirschberg (2001), and Rodríguez-Concepción & Boronat (2002).

commercial production in Singapore, Thailand and other Southeast Asian countries (Chong & Kavaljian 1989). Plants of *Oncidium* Gower Ramsey was introduced to Taiwan in 1986. Because of the suitable location and good adaptability, high quality *Oncidium* cut flowers have been widely accepted by consumers and with market potential. The yellow color of the *Oncidium* flowers is the accumulation of carotenoids in petals and labellum. Those bi-color flowers were a mixture of carotenoids and anthocyanins (Hieber *et al.* 2006). To understand how the genes of carotenoids biosynthesis play a role in different developmental stages and their levels of expression, this study was designed to clone, characterize and examine the expression levels of ζ-carotene desaturase (*ZDS*) gene from *Oncidium* Gower Ramsey in the transgenic tobacco following the developmental sequence. The functional analysis of the gene was also applied.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant materials

The flowering plants of *Oncidium* Gower Ramsey were grown in a greenhouse at Fengshan Tropical Horticulture Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute. Flower buds and fully-opened flowers, mature leaves and roots were sampled in the five developmental stages for total RNA extraction and subsequent gene expression analysis (Fig. 2).

### RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted by using TRIZOL reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instruction. Quality of the purified RNA was determined by measuring the ratio of absorbance at 260 and 280 nm on a spectrophotometer (U2000, Hitachi Instruments, Tokyo, Japan) and by agarose gel electrophoresis. RNA with ratio of OD260/OD280 ranging from 1.8 to 2.0 was used for cDNA synthesis. The cDNA of *Oncidium ZDS* was PCR (polymerase chain reaction) cloned by using degenerate primers based on conserved amino acid residues of several plant species from NCBI (National Center for Biotechnology Information) database. The primers used in this study are shown in Table 1. The cDNA was synthesized by using SMART$^{TM}$ PCR cDNA Synthesis kit (Clontech, California, USA). The procedure is as follows: 0.5 μg total RNA, 1 μL SMART II primer (10 μM), and 1 μL 3' RACE CDS primer (10 μM) were included in a final volume of 5 μL reaction solution. After incubating at 70℃ for 2 min, 2 μL 5× first-strand buffer, 1 μL DTT (dithiothreitol) mix (20 mM), 1 μL dNTP (deoxy-ribonucleoside triphosphate) mix (10 mM), and 200 units of Superscript II MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) were added to the reaction mixture. The tube was then incubated at 42 ℃ for 1 h. Two μL of first strand cDNAs, 4 μL SMAR II (10 μM) and 5' RACE CDS primers (10 μM, Table 1), 10 μL 10× Advantage 2

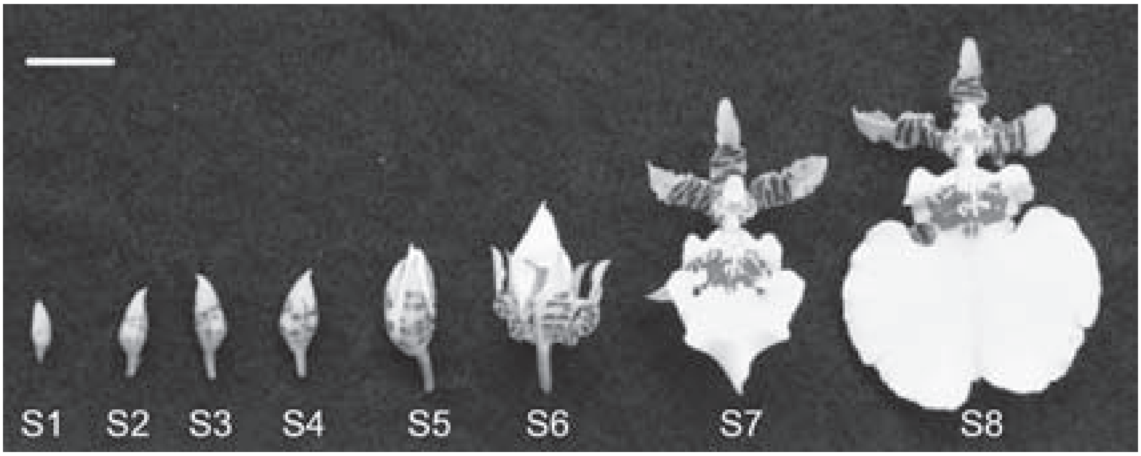


**Fig. 2.** Morphology of eight flower development stages. Length of flower bud: S1, < 0.5 cm bud; S2, 0.5–0.7 cm bud; S3, 0.7–0.9 cm bud; S4, 0.9–1.0 cm bud; S5, 1.0–1.1 cm bud; S6, 1.1–1.2 cm bud; S7, 1.2–2.5 cm half-open flower; and S8, fully open flower. Bar = 1 cm.

**Table 1.** Degenerated and other primer pairs used for *OncZDS* cloning, plasmid construction and gene expression analysis in this study.

| Primer name | Sequence of primer |
|---|---|
| D-ZDS forward | 5'-AAYGCNCCNAARGGNYTNTTYCCN-3'[z] |
| D-ZDS reverse | 5'-CARGAYTAYATYGAYTCNATGGAR-3' |
| G-ZDS forward | 5'-TTGACTGTGATAACATCAGTGCTCGGTGTATG-3' |
| G-ZDS reverse | 5'-CAAGATCTGCAAAGCAGGAGAAGTCAGCATCTGGAG-3' |
| N-ZDS forward | 5'-GTATGCTCACCATCTTTGCTCTGTTTGC-3' |
| N-ZDS reverse | 5'-ACAGATTATCAAACATGTCCCATTCTCTCC-3' |
| E-ZDS forward | 5'-GGGCTAAAGTTTTCGATCTGAATCC-3' |
| E-ZDS reverse | 5'-TTCACTATTATACTACAGGGCACACTCAGC-3' |
| P-ZDS forward | 5'-GCG GGA TCC GGGCTAAAGTTTTCGATCTGAATCC-3'[y] |
| P-ZDS reverse | 5'-GCG GAG CTC TTCACTATTATACTACAGGGCACACTCAG-3'[x] |
| SMART II | 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3' |
| 3' RACE CDS | 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3' |
| 5' RACE CDS | 5'-$(T)_{25}N_{-1}N$-3' |
| UPM-long | 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAG AGT-3' |
| UPM-short | 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' |
| NUP | 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' |
| *actin* forward | 5'-AGTTGAACCTCCACTGAGCAC-3' |
| *actin* reverse | 5'-GGGCACCTGAACCGCTCGGCTCC-3' |
| 353-F | 5'-AAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGG-3' |

[z] Y = C, T; W = A, T; D = A, G, T; R = A, G; V = A, C, G; H = A, C, T; M = A, C, $N_{-1}$ = A, G or C; and N = A, C, G or T.
[y] Underlined sequences indicate the cutting site of restriction enzyme *Bam*HI.
[x] Underlined sequences indicate the cutting site of restriction enzyme *Sac*I.

PCR Buffer, 2 μL dNTP mix (10 mM) and 2 μL Advantage 2 PCR Polymerase Mix (Clontech, Mountain View, California, USA) were mixed together and proceeded for long distance PCR to amplify double-strand cDNA. The PCR reaction was programmed as follows: 1 initial denaturing cycle at 95℃ for 1 min, 24 cycles of 5 s denaturing at 95℃, 5 s annealing at 65℃, 6 min extension at 68℃ (ABI Gene Amp PCR system 2700). The quality of the double-strand cDNAs was checked by 1% agarose gel electrophoresis.

## Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

SMART™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech, Mountain View, California, USA) was used for full length *OncZDS* amplification. Brief steps are as follows: 3 μL total RNA, 1 μL 5'-CDS primer, and 1 μL SMART II A oligo were mixed in a 0.2 mL tube, and heated for 2 min at 70℃, and cooled for 2 min on ice. Then 2 μL 5× first-strand buffer, 1 μL 20 mM DDT, 1 μL 10 mM dNTP mix, and 1 μL Power Script Reverse MMLV transcriptase (Roche Molecular Systems, Pleasanton, California, USA.) were mixed and incubated at 42℃ for 1.5 h, and heated at 70℃ for 7 min to end the reaction, and stored at -20℃. Three μL of total RNA, 1 μL 5'-CDS primer, and 1 μL dd$H_2O$ were mixed as described above to synthesize 3'-RACE-Ready cDNA. PCR cycles were programmed as follows: 5 cycles of 10 s denaturation at 94℃, 3 min annealing and extension at 72℃. Five cycles of 10 s denaturation at 94℃, 15 s annealing at 71℃, 3 min extension at 72℃, and then 20 cycles of 10 s denaturation at 94℃, 15 s annealing at 70℃, 3 min extension at 72℃. PCR products were stored at 4℃ until use.

## PCR product purification and cloning

PCR product was purified by using QIAEX®II Gel Extraction kit (Qiagen, Valencia, California, USA). DNA bands were cut off the agarose gel after

electrophoresis, and placed into a 1.5 mL tube to which 300 μL Buffer QX1 was added per 0.1 g gel block. After adding 10 μL QIAEXII., the mixture was heated at 50℃ for 10 min, centrifuged for 30 s at 13,000 rpm (16,110× *g*), and the supernatant discarded and the precipitate washed by using 500 μL Buffer QX1 twice. The DNA pellet was redissolved with 20 μL dd$H_2O$. The purified PCR fragment was ligated into pGEM-T Easy vector by using T4 DNA ligase (Promega, Madison, Wisconsin, USA), and transformed into competent cells of JM109 at 42℃ by heat shock, and streaked on LB/ampicillin (100 μg $mL^{-1}$) medium containing X-gal (40 mg $mL^{-1}$) and IPTG (50 mg $mL^{-1}$) for 18 to 20 h at 37℃. Those white colonies were individually picked and analyzed for insert fragment check by PCR.

## Bioinformatics analysis

The analysis of the deduced amino acid sequence was performed by using Omiga 2.0 software (Oxford Molecular, Cambridge, United Kingdom). Amino acid sequence comparison with homologs from other plants was conducted by using BLAST of GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Multiple sequence alignment was performed by using MegAlign program of DNAstar software (DNAstar, Madison, USA).

## Semiquantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from flower buds, open flowers, leaves and roots by the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Single strand cDNA was synthesized by using the SMART™ PCR cDNA Synthesis kit following the instruction of the manufacturer (Clontech, Mountain View, California, USA). The specific primer pairs G-PSY forward, G-PSY reverse and *actin* primer pairs (Table 1) were used for PCR amplification. The housekeeping gene *actin* was designed based on the sequence of *Populas trichocarba* (EF418792) using the Lasergene Primer Select (DNAStar, Madison WI, USA) software. PCR cycles were programmed as follows: 1 cycle of 2 min denaturation at 94℃. Five cycles of 10 s denaturation at 94℃, 10 s annealing at 60℃, 40 s extension at 72℃, and then 27 cycles of 10 s denaturation at 94℃, 10 s annealing at 55℃, and 40 s at 72℃. PCR products were stored at 4℃ until use. The PCR products of *OncPSY* and *actin* were separated on a 2% agarose gel and analyzed by Alpha Imager software (Clontech, Mountain View, California, USA). Data were analyzed and chart generated by using Sigma Plot 9.0 software (Systat software, San Jose, California, USA.).

## Plasmid construction

The *OncZDS* coding sequence was amplified from *Oncidium* Gower Ramsey labellum cDNA using P-ZDS primer pairs (Table 1). After the cleavage with *Bam*HI and *Sac*I, the *OncZDS* fragment was ligated into *Bam*HI and *Sac*I restriction site of the binary vector pBI121 and the resulting vector designated pBIZDS. The vector pBIZDS was re-cleaved with *Hind*III and *Eco*RI to generate a fragment containing 35S promoter, *OncZDS* gene and NOS terminator and was then ligated into another binary vector pCAMBIA 1305.1, renamed as pOncZDS to provide GUS gene for identification of transgenic plant.

## Plant transformation and regeneration

*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NC was transformed with the construct pOncZDS by *Agrobacterium tumefaciens*. The transformation was performed as follows: tobacco seeds were surfaced sterilized and sown in Murashige & Skoog (1962) medium for germination. Leaves were cut into 0.5 cm × 0.5 cm disks from 4 wk old seedlings and co-cultured with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404/pOncZDS at 26℃ for 3 d in the dark then washed with sterile water and transferred onto MS medium containing 0.5 mg $L^{-1}$ benzylaminopurine, 50 mg $L^{-1}$ hygromycin and 300 mg $L^{-1}$ cefotaxime. Hygromycin resistant adventitious shoots were cut off and transferred onto fresh selection medium without hormone. The established plantlets were potted, grown in the greenhouse and positive transformant identified by GUS stain, PCR and southern hybridization.

## Pigment isolation and quantification

Fifteen mL of hexane/acetone/ethanol (2:1:1, v/v/v) was added to 0.3–0.6 g of fresh *Oncidium* tissues (flower buds, leaves and roots) and mixed thoroughly until the tissue was bleached. The organic solvent phase was separated by the addition of 2 mL water and the hexane fraction dried in a stream of nitrogen gas at room temperature and resuspended in acetone. Total carotenoids and chlorophylls were determined by spectrophotometrically method (Arnon *et al.* 1954).

# RESULTS

## Cloning ζ-carotene desaturase gene from *Oncidium* Gower Ramsey

To isolate the *ZDS* gene from *Oncidium* Gower Ramsey, a strategy that combined RT-PCR and RACE was used. A cDNA fragment was amplified by RT-PCR using total RNA from labellum as a template. Comparison of deduced amino acid sequence with several ZDS led to the confirmation of partial sequence of *Oncidium ZDS*. The full-length *ZDS* cDNA sequence from *Oncidium* Gower Ramsey (*OncZDS*) was obtained by using RACE. The *OncZDS* contains 1,986 nucleotides, with 68 bp and 226 bp of 5' and 3' untranslated regions (UTR), respectively. *OncZDS* encodes a protein with 563 amino acids, which shows high sequence similarity to the peptide sequence of orchid (*Oncidium* Gower Ramsey, ACP27625, 99.5% identity) and tomato (*Solanum lycopersicum*, ABD67160.1, 75% identity).

## Phylogenic analysis of *OncZDS*

Comparisons of *OncZDS* with ZDS of 24 other plant species were carried out by BLASTp method (Altschul *et al.* 1997). The results showed all of 25 ZDS sequences perfectly separated into two groups. One was dicotyledonous group, including citrus (*Citrus sinensis*, CAC85667.1; *Citrus unshiu*, BAB68552.1; *Citrus maxima*, ACE79169.1; *Citrus x paradise*, AAK51557.1), black cottonwood (*Populus trichocarpa*, XP_002319628.1), barbados nut (*Jatropha curcas*, ACT87979.1), apple (*Malus x domestica*, AAQ04225.1), strawberry (*Fragaria x ananassa*, ACR61394.1), papaya (*Carica papaya*, ACO40527.1), arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, AAM63349.1), turnip rape (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*, ACM68701.1), grape (*Vitis vinifera*, XP_002277348.1), great yellow gentian (*Gentiana lutea*, BAA88843.1), tomato (*Solanum lycopersicum*, ABD67160.1), chili pepper (*Capsicum annuum*, 2121278A), wild carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*, ABB52070.1), sunflower (*Helianthus annuus*, CAD55814.2), chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium*, BAE79555.1) and cream narcissus (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*, ABX45112.1), the other group, monocotyledonous includes corn (*Zea mays*, ACG46735.1),sorghum (*Sorghum bicolor*, AAX56323.1), bread wheat (*Triticum aestivum*, ACI04664.1), rice (*Oryza sativa* Japonica Group, NP_001059145.1) and yellow *Oncidium* (*Oncidium* 'Gower Ramsey', ACP27625.1) (Fig. 3, Table 2).

## Expression of *OncZDS* in *Oncidium* tissues

To explore the expression patterns for *OncZDS* in different tissues of *Oncidium* Gower Ramsey, semi-quantitative RT-PCR analysis was used. As the expression levels of both *OncZDS* and *actin* genes within 32–38 PCR cycles were visually detectable in agarose gel, 36 cycles were chosen for semi-quantitative determination of *OncZDS* in this study. The transcript level of *OncZDS* was detected in roots, leaves, and different flower bud stages (S1–S8). The transcript level of early steps of the carotenoid biosynthesis pathway gene *OncZDS* was high in vegetative tissues and flower, and lower in root. During flower development, *OncZDS* expression increased as flower developed until stage 5 and 6 (Fig. 4). The *OncZDS* expression showed a downward trend, while newly open flowers (with labellum visible, stage 6 and 7) increased until flower fully open (stage 8). Meanwhile, total chlorophyll content was highest at stage 1 buds and decreased steadily as flowers matured; while total carotenoids content increased with flower development until fully open (data not shown).

## Construction of plant transformation vector

Plasmid pBI121 was used for subcloning to retain the GUS gene as a reporter. Restriction sites were generated by E-ZDS forward and E-ZDS reverse primer pairs by PCR, generating a 1,849 bp fragment which contained *Bam*HI and *Sac*I cutting sites. Both two restriction enzymes help the directional cloning of *OncZDS* into plasmid pBI121 and the generation of new plasmid named pBIZDS. The intermediate vector pBIZDS was cut by *Hind*III and *Eco*RI, and 2,720 bp fragment containing 35S promoter region (871 bp), *OncZDS* gene (1,849 bp) and NOS terminator region (267 bp) were obtained. The fragment was subcloned into pCAMBA1305.1 vector by restriction digestion (*Hind*III and *Eco*RI) and the ligation product generated new binary vector named pOncZDS. To confirm the correctness of the plasmid construction, the results from PCR by 35S and NOS primers proved the *OncZDS* insertion in expected location. Meanwhile, 35S-F and E-ZDS-re-

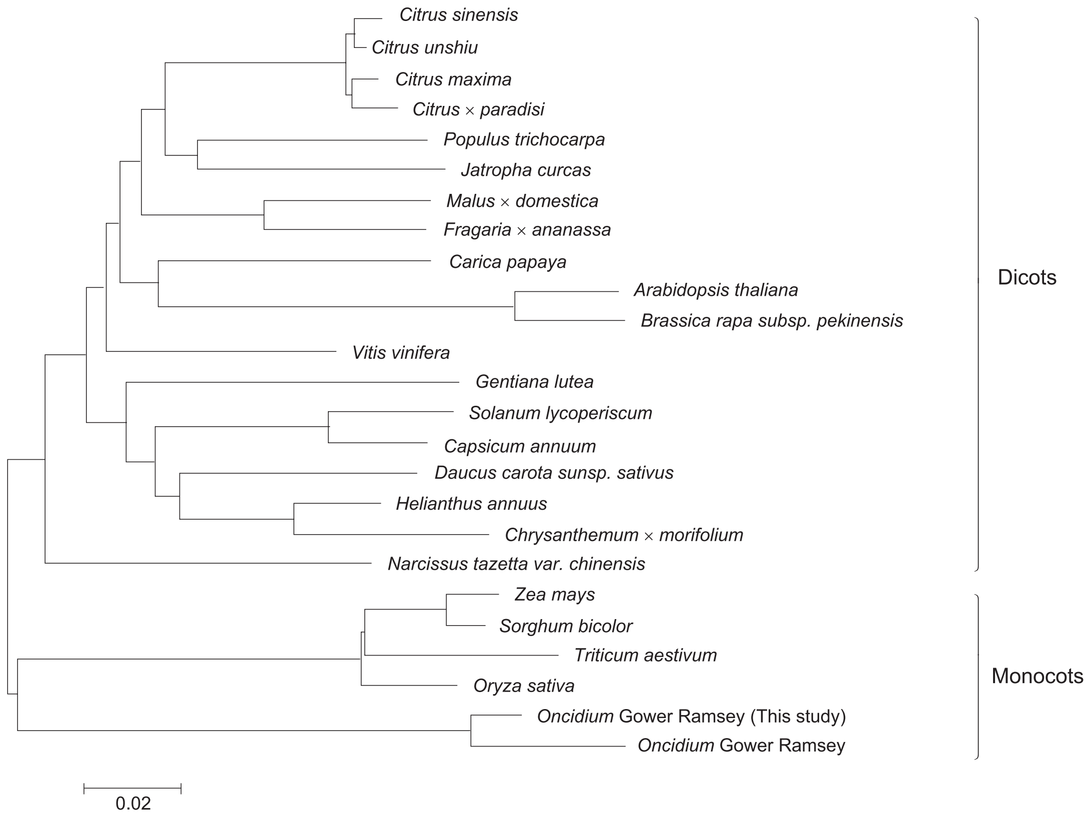


**Fig. 3.** Phylogenetic tree of *Onc*ZDS with other plants on amino acid sequence of full length protein by BLAST programs. Scale bar represents 0.02 expected amino acid residue substitutions per site. *Citrus sinensis*, CAC85667.1; *Citrus unshiu*, BAB68552.1; *Citrus maxima*, ACE79169.1; *Citrus × paradise*, AAK51557.1; *Populus trichocarpa*, XP_002319628.1; *Jatropha curcas*, ACT87979.1; *Vitis vinifera*, XP_002277348.1; *Malus × domestica*, AAQ04225.1; *Fragaria × ananassa*, ACR61394.1; *Carica papaya*, ACO40527.1; *Gentiana lutea*, BAA88843.1; *Solanum lycopersicum*, ABD67160.1; *Capsicum annuum*, 2121278A; *Daucus carota* subsp. Sativus, ABB52070.1; *Helianthus annuus*, CAD55814.2; *Chrysanthemum × morifolium*, BAE79555.1; *Narcissus tazetta var.* chinensis, ABX45112.1; *Arabidopsis thaliana*, AAM63349.1; *Brassica rapa* subsp. Pekinensis, ACM68701.1; *Triticum aestivum*, ACI04664.1; *Oryza sativa* Japonica Group, NP_001059145.1; *Sorghum bicolor*, AAX56323.1; *Zea mays*, ACG46735.1; *Oncidium* Gower Ramsey, this study; and *Oncidium* Gower Ramsey, ACP27625.1.

verse primers gave rise to a 2,113 bp DNA fragment; 35S-F and NOS-3 primers with a 2,380 bp fragment. Southern hybridization also confirmed the results of PCR check, indicating the binary vector pOncZDS was as good as designed (Fig. 5).

## Ectopic overexpression of *35S::OncZDS* alters leaf morphology and increases carotenoid content

The p*OncZDS* containing coding sequence of *OncZDS* was expressed in sense orientation under control of a duplicated 35S RNA promoter in transgenic tobacco. Transgenic plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of leaf discs (Fig. 6A) were transplanted and moved to the greenhouse; after 6 to 7 wk, the contents of carotenoids and chlorophyll in the plants were determined by a spectrophotometer. The transgenic tobacco showed insignificant change of flower color as compared to the wildtype (Fig. 6B). The leaves of transgenic tobacco showed signs of shrinkage and bifurcation (Fig. 6C and Fig. 6D) with a smaller size (Fig. 6E and Fig. 6F). The transgenic tobaccos showed increased carotenoids and chlorophyll contents up to 235.4 ± 2.0, and 158.9 ± 3.9 μg $g^{-1}$ FW, respectively. In average, transgenic tobacco plants increased

**Table 2.** Amino acid sequence similarity (%) of OncZDS compared to the homologous genes of some other plant species.

| | 1[z] | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 99.2 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 98.5 | 98.7 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 98.5 | 98.7 | 98.3 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 85.7 | 86.1 | 85.9 | 85.7 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 84.6 | 85.2 | 84.6 | 84.2 | 86.9 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 84.6 | 85.1 | 84.9 | 84.6 | 82.6 | 82.1 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 85.9 | 86.2 | 86.2 | 85.9 | 84.4 | 82.9 | 84.6 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 86.1 | 86.6 | 86.1 | 85.9 | 83.1 | 82.6 | 83.4 | 91.7 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 86.6 | 86.9 | 86.4 | 86.1 | 85.1 | 84.4 | 84.1 | 83.4 | 83.9 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | 80.3 | 80.8 | 80.4 | 80.1 | 78.6 | 78.8 | 81.3 | 79.6 | 79.4 | 78.6 | 100 | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 80.6 | 81.1 | 80.8 | 80.4 | 79.6 | 78.9 | 80.1 | 79.6 | 79.9 | 78.6 | 81.9 | 100 | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | 81.4 | 81.9 | 81.6 | 81.3 | 79.3 | 79.3 | 80.3 | 80.4 | 80.8 | 79.8 | 81.3 | 94.2 | 100 | | | | | | | | | | | | |
| 14 | 82.6 | 83.1 | 82.8 | 82.4 | 81.4 | 80.6 | 82.4 | 81.1 | 81.4 | 81.6 | 81.6 | 83.3 | 82.3 | 100 | | | | | | | | | | | |
| 15 | 81.6 | 82.1 | 81.6 | 81.6 | 80.6 | 80.3 | 81.6 | 81.3 | 80.3 | 80.4 | 82.6 | 84.6 | 84.4 | 86.1 | 100 | | | | | | | | | | |
| 16 | 80.9 | 81.4 | 80.9 | 80.6 | 79.3 | 78.1 | 79.9 | 80.1 | 78.9 | 78.6 | 80.1 | 82.6 | 83.1 | 84.2 | 90.9 | 100 | | | | | | | | | |
| 17 | 83.4 | 83.7 | 83.1 | 82.8 | 80.8 | 80.8 | 82.4 | 82.3 | 81.4 | 81.4 | 78.6 | 78.8 | 78.9 | 80.9 | 80.4 | 79.1 | 100 | | | | | | | | |
| 18 | 81.8 | 82.1 | 81.9 | 81.4 | 79.8 | 78.6 | 82.1 | 80.4 | 80.9 | 83.1 | 75.8 | 76.6 | 76.1 | 78.8 | 77.3 | 77.1 | 79.4 | 100 | | | | | | | |
| 19 | 82.6 | 82.9 | 82.8 | 82.3 | 80.1 | 79.3 | 80.4 | 80.4 | 80.4 | 82.1 | 75.3 | 76.3 | 75.8 | 78.4 | 77.1 | 76.5 | 79.4 | 94.2 | 100 | | | | | | |
| 20 | 77.4 | 77.6 | 77.6 | 77.4 | 75.3 | 74.0 | 78.1 | 78.9 | 78.9 | 77.3 | 75.1 | 75.6 | 76.3 | 75.0 | 75.8 | 75.0 | 77.9 | 76.1 | 75.6 | 100 | | | | | |
| 21 | 78.6 | 78.9 | 78.8 | 78.6 | 76.5 | 74.6 | 78.9 | 79.8 | 79.3 | 77.4 | 77.1 | 77.4 | 77.4 | 76.5 | 76.6 | 75.5 | 77.9 | 76.6 | 76.3 | 89.9 | 100 | | | | |
| 22 | 78.1 | 78.3 | 78.4 | 77.9 | 75.8 | 74.1 | 78.6 | 79.3 | 79.8 | 77.1 | 76.5 | 77.8 | 78.6 | 76.1 | 77.3 | 75.6 | 77.4 | 76.5 | 76.3 | 90.0 | 91.0 | 100 | | | |
| 23 | 77.9 | 78.1 | 78.3 | 77.8 | 75.8 | 73.8 | 78.4 | 79.1 | 79.9 | 76.8 | 76.0 | 77.6 | 77.9 | 76.1 | 76.9 | 75.5 | 76.9 | 76.8 | 76.6 | 89.1 | 70.7 | 97.0 | 100 | | |
| 24 | 77.9 | 78.1 | 77.8 | 77.3 | 74.8 | 74.1 | 76.9 | 77.8 | 77.8 | 77.3 | 74.8 | 73.6 | 74.3 | 74.1 | 73.8 | 72.8 | 78.4 | 75.6 | 76.0 | 75.6 | 75.6 | 75.8 | 75.5 | 100 | |
| 25 | 79.6 | 79.8 | 79.4 | 78.9 | 76.3 | 76.0 | 78.6 | 79.3 | 79.3 | 79.3 | 76.6 | 75.0 | 75.6 | 76.0 | 75.5 | 74.5 | 80.6 | 77.6 | 77.9 | 77.3 | 77.3 | 77.4 | 77.1 | 96.2 | 100 |

[z] 1: *Citrus sinensis*, CAC85667.1; 2: *Citrus unshiu*, BAB68552.1; 3: *Citrus maxima*, ACE79169.1; 4: *Citrus x paradise*, AAK51557.1; 5: *Populus trichocarpa*, XP_002319628.1; 6: *Jatropha curcas*, ACT87979.1; 7: *Vitis vinifera*, XP_002277348.1; 8: *Malus x domestica*, AAQ04225.1; 9: *Fragaria x ananassa*, ACR61394.1; 10: *Carica papaya*, ACO40527.1; 11: *Gentiana lutea*, BAA88843.1; 12: *Solanum lycopersicum*, ABD67160.1; 13: *Capsicum annuum*, 2121278A; 14: *Daucus carota* subsp. Sativus, ABB52070.1; 15: *Helianthus annuus*, CAD55814.2; 16: *Chrysanthemum x morifolium*, BAE79555.1; 17: *Narcissus tazetta var*. chinensis, ABX45112.1; 18: *Arabidopsis thaliana*, AAM63349.1; 19: *Brassica rapa* subsp. Pekinensis, ACM68701.1; 20: *Triticum aestivum*, ACI04664.1; 21: *Oryza sativa* Japonica Group, NP_001059145.1; 22: *Sorghum bicolor*, AAX56323.1; 23: *Zea mays*, ACG46735.1; 24: *Oncidium* Gower Ramsey, this study; and 25: *Oncidium* Gower Ramsey, ACP27625.1.

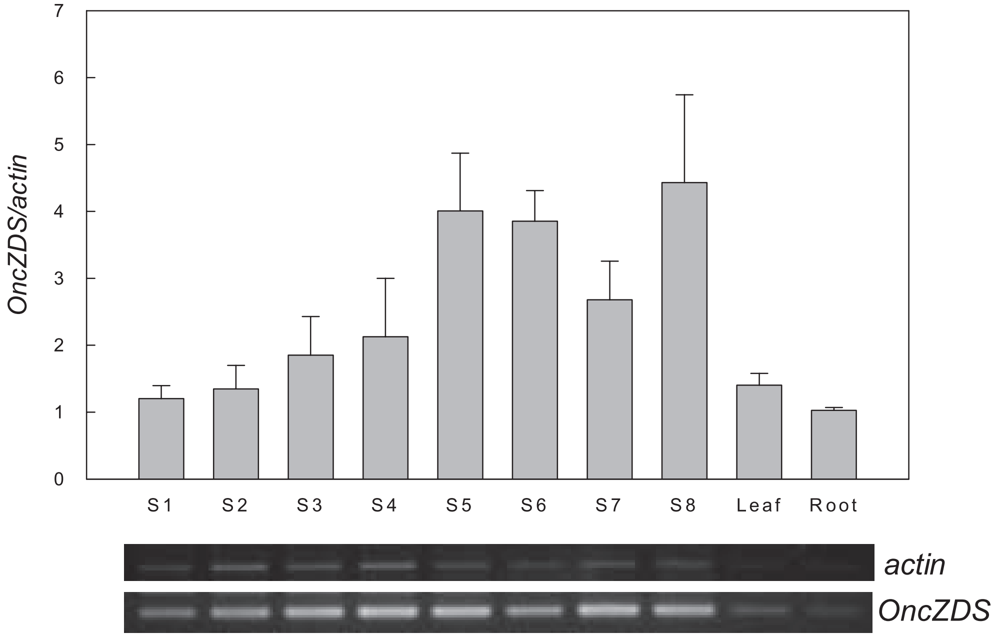


**Fig. 4.** Relative expression level (%) of ZDS transcripts estimated by RT-PCR. The amplification of *OncZDS* and *actin* transcripts were performed using 5 µg of total RNA isolated from different stages of flower, leaves and roots. The PCR products were resolved on a TAE 2.0% agarose gel. The relative expression level of the *ZDS* transcripts, expressed as a percentage with respect to the *actin* level, was estimated by measuring the intensity of ethidium bromide fluorescence of the PCR products resolved by gel electrophoresis. Error bar is the standard error of mean (*n* = 3). S1 to S8, different floral stages as shown in Fig. 2.

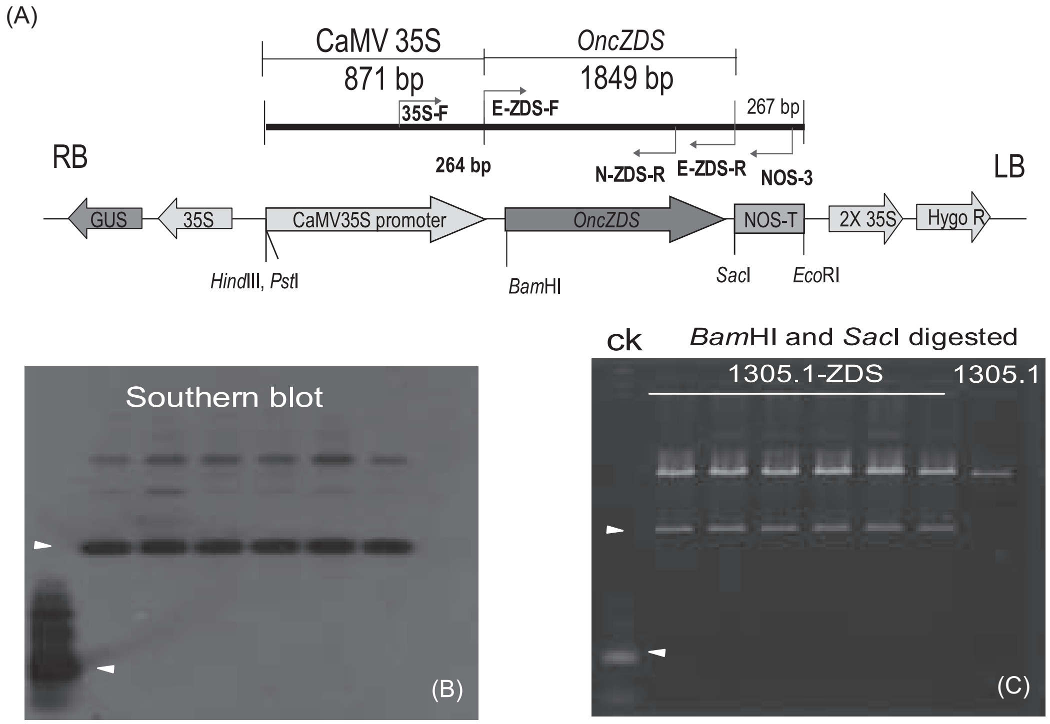


**Fig. 5.** Construction of p*OncZDS*. (A) Generation of a chimeric construct; p*OncZDS* containing *OncZDS* coding region; (B) PCR confirmed the construct of plasmid; and (C) Southern hybridization confirmation.

13% chlorophyll and 10% carotenoids and the ratio of chlorophyll to carotenoids was also increased (Table 3).

## DISCUSSION

In recent years, the regulation of carotenoids in flowers has been widely studied (Naik *et al.* 2003; Giuliano *et al.* 2008; Zhu *et al.* 2010). To further understand the control mechanism of the *Oncidium* floral pigmentation, this study used rapid amplification of cDNA ends to clone the gene of ζ-carotene desaturase (ZDS), which affects carotenoids biosynthesis of flowers. Its amino acid sequence is highly conserved, but with some variations in N-terminal and C-terminal parts of the protein, as compared to other plant ZDS. Phylogenetic analysis just perfectly separated ZDS in all 25 plants, including Oncidium, into two groups of monocots or dicots.

*OncZDS* expression is tissue-specific and increased by flower expansion levels. In great yellow gentian, *GtZDS* (*Gentiana lutea*) transcript was detected in pistils, stamens, sepals and leaves, and especially in petals, but almost none in the stem (Zhu *et al.* 2002). In *Arabidopsis*, *AtZDS* expressed mostly in the leaves (Dong *et al.* 2007). In chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*), *CmZDS* was detectable in white, yellow or orange flowers but higher in yellow than white one (Kishimoto & Ohmiya 2006). Meanwhile, ZDS was a key enzyme controlling the carotenoids biosynthesis when flowers unfolded, with its expression increased gradually (Kishimoto & Ohmiya 2006; Chiou *et al.* 2010; Zhu *et al.* 2010).

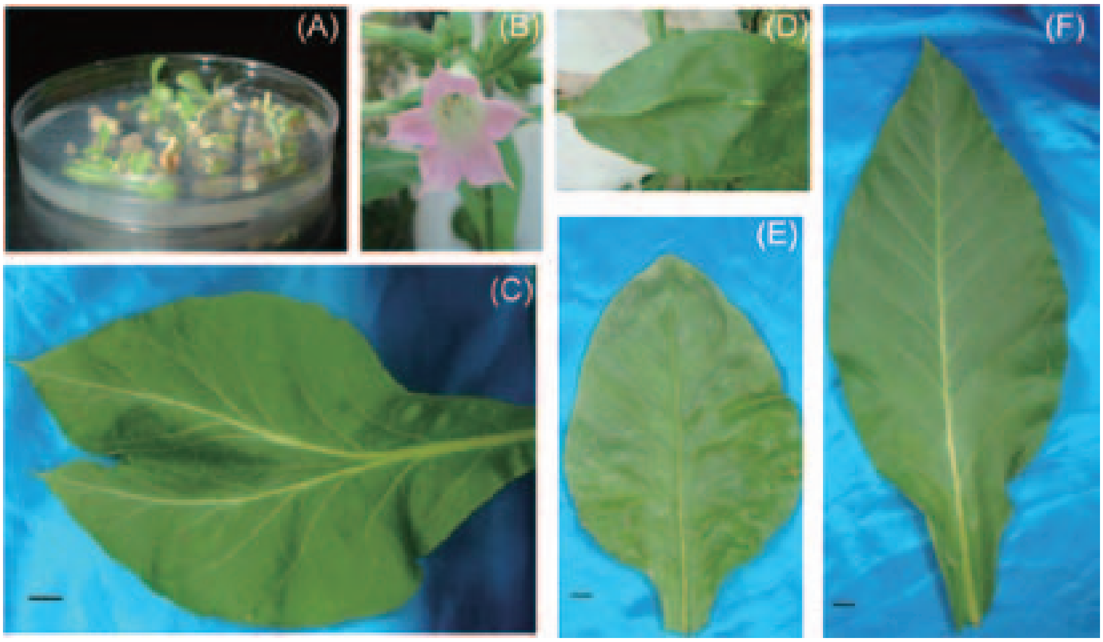


**Fig. 6.** Ectopic expression of *35S::OncZDS* in tobacco causes severe phenotypic effects. (A) hygromycin was used for selection marker and untransformed tobacco shown etiolating; (B) flower color was insignificant change compared with wile type tobacco; (C) transgenic tobacco lines showed bifurcation leaves; (D) transgenic tobacco showed shrinkage vein; (E) overexpression *35S::Onc*ZDS reduced leaf size; and (F) wild type tobacco leaf. Bar = 1 cm.

**Table 3.** Chlorophylls and carotenoids of selected transgenic tobacco plants expressing *OncZDS*.

| Line | Chlorophyll a (μg $g^{-1}$ FW) | Chlorophyll b (μg $g^{-1}$ FW) | Total chlorophylls (μg $g^{-1}$ FW) | Total carotenoids (μg $g^{-1}$ FW) | Chlorophylls to carotenoids ratio |
|---|---|---|---|---|---|
| *35S::OncZDS* | 122.3 ± 3.0[z] | 36.1 ± 0.9 | 158.9 ± 3.9 | 235.4 ± 2.0 | 0.68 |
| Control | 113.2 ± 2.6 | 26.7 ± 0.2 | 140.0 ± 1.5 | 214.6 ± 1.8 | 0.65 |

[z] Mean ± standard error (*n* = 3).

When ZDS gene was inhibited, not only the flower color but also plant phenotype affected (Qin *et al.* 2007). For example, mutation of *Arabidopsis* ZDS gene caused the appearance of plant in light green color and displayed ABA deficiency symptoms and a downstream biosynthetic pathway of carotenoids (Hirayama *et al.* 1994). Mutation in ZDS of arabidopsis indirectly increased photo-oxidation, leading to increased reactive oxygen species (ROS) content and a bleaching effect. Serious ZDS mutations affect the original physiological function and easy to produce lethal seedlings (Dong *et al.* 2007). Results suggest that the function of ZDS is not just for flower color but is also important for plant growth and development.

Despite insignificant flower color change in *35S::OncZDS* transgenic tobacco, their carotenoids and chlorophylls were increased. Such a result is similar to overexpressing *GlZds* gene of *Gentiana lutea* in transgenic tobacco, with 91% increase of β-carotene in leaves and 49% increase in flowers (Jing *et al.* 2009). Meanwhile, the phenotype of *35S::OncZDS* transgenic tobacco with unusual reduced size, shrinkage and bifurcation of leaves were similar to overexpression of *OncPSY* (Lee 2012).

Alteration of flower color by genetic engineering to modify the flavonoid biosynthetic pathways has already been achieved (Forkmann & Martens 2001). Similar achievements have also been made for carotenoid pigments. When suppressing carotenoids cleavage dioxygenase 4a (CmCCD4a) of white chrysanthemum by RNAi, transgenic plants show yellowish color (Ohmiya *et al.* 2006). Expression antisense CRTL-b2 (LYCb2) mRNA would make yellow potato showing orange petals (Ronen *et al.* 2000). Overexpression tree tobacco, *Ng*CRTO (*Nicotiana glauca*, β-carotene ketolase) in transgenic cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803 would make yellow flower change into orange (Zhu *et al.* 2010).

In this study, we have cloned full length *ZDS* cDNA from *Oncidium* orchid. Ectopic expression *35S::OncZDS* in transgenic tobaccos caused changes in leaf phenotype and the increase of carotenoids and chlorophylls. Interfering the genes of carotenoid biosynthesis would not only affect color but also phenotype, sometimes even caused a seedling lethal (Hirayama *et al.* 1994; Dong *et al.* 2007). The results from this work and others indicated the importance of ZDS gene function in regulating growth and development of plants. In the future, we will try to screen the promoter for petal specific expression in order to reduce the negative effects of genes on plant physiological processes. Attempts will also be made to increase the diversity of *Oncidium* orchid flower color by genetic manipulation for improving market needs of *Oncidium*, in cut flowers or potted flower plants.

## REFERENCES


Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389–3402.

Arnon, D. I., M. B. Allen, and F. R. Whatley. 1954. Photosynthesis by isolated chloroplasts. Nature 174:394–396.

Chiou, C. Y., H. A. Pan, Y. N. Chuang, and K. W. Yeh. 2010. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in floral tissues of Oncidium cultivars. Planta 232:937–948.

Chong, J. G. and L. G. Kavaljian. 1989. Orchid industry of Singapore. Econ. Bot. 43:241–254.

Christinet, L. 2004. Characterization and Functional Identification of a Novel Plant Extradiol 4, 5-Dioxygenase Involved in Betalain Pigment Biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. Doctoral Dissertation. University of Lausanne. Lausanne. 137 pp.

Cunningham, F. X. and E. Gantt. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:557–583.

Dong, H., Y. Deng, J. Mu, Q. Lu, Y. Wang, Y. Xu, C. Chu, K. Chong, C. Lu, and J. Zuo. 2007. The Arabidopsis spontaneous cell dath1 gene, encoding a zeta-carotene desaturase essential for carotenoid bio-synthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. Cell Res. 17:458–470.

Eisenreich, W., F. Rohdich, and A. Bacher. 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. Trends Plant Sci. 6:78–84.

Forkmann, G. and S. Martens. 2001. Metabolic engineering and applications of flavonoids. Curr. Opin. Biotechnol. 12:155–160.

Giuliano, G., R. Tavazza, G. Diretto, P. Beyer, and M. A. Taylor. 2008. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. Trends Biotechnol. 26:139–145.

Grotewold, E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. Annu. Rev. Plant Biol. 57:761–780.

He, F., L. Mu, G. L. Yan, N. N. Liang, Q. H. Pan, J. Wang, M. J. Reeves, and C. Q. Duan. 2010. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. Molecules 15:9057–9091.

Hieber, A. D., R. G. Mudalige-Jayawickrama, and A. R. Kuehnle. 2006. Color genes in the orchid *Oncidium* Gower Ramsey: Identification, expression, and potential genetic instability in an interspecific cross. Planta 223:521–531.

Hirayama, O., K. Nakamura, S. Hamada, and Y. Kobayasi. 1994. Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. Lipids 29:149–150.

Hirschberg, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. Curr. Opin. Plant Biol. 4:210–218.

Jing, J. I., G. Wang, J. Wang, and P. Wang. 2009. Functional analysis of multiple carotenogenic genes from *Lycium barbarum* and *Gentiana lutea* L. for their effects on β-carotene production in transgenic tobacco. Biol. Lett. 31:305–312.

Josse, E. M., A. J. Simkin, J. Caffe, A. M. Laboure, M. Kuntz, and P. Carol. 2000. A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. Plant Physiol. 123:1427–1436.

Kishimoto, S. and A. Ohmiya. 2006. Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). Physiol. Plant. 128:436–447.

Lee, W. L. 2012. Cloning and Functional Characterization of Carotenogenic Genes of *Oncidium* Gower Ramsey. Doctoral Dissertation. National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung.

Moehs, C. P., L. Tian, K. W. Osteryoung, and D. DellaPenna. 2001. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. Plant Mol. Biol. 45:281–293.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.

Naik, P. S., A. S. M. Chanemougasoundharam, S. M. Khurana, and G. Kalloo. 2003. Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants. Curr. Sci. 85:1423–1430.

Ohmiya, A., S. Kishimoto, R. Aida, S. Yoshioka, and K. Sumitomo. 2006. Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. Plant Physiol. 142:1193–1201.

Pridgeon, A. M., E. Hagsater, and V. Dumont. eds. 1996. Orchids: Status Survey And Conservation Action Plan. IUCN, Gland. 139 pp.

Qin, G., H. Gu, L. Ma, Y. Peng, X. W. Deng, Z. Chen, and L. J. Qu. 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. Cell Res. 17:471–482.

Rodríguez-Concepción, M. and A. Boronat. 2002. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. Plant Physiol. 130:1079–1089.

Ronen, G., L. Carmel-Goren, D. Zamir, and J. Hirschberg. 2000. An alternative pathway to β-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of *Beta* (*B*) and *old-gold* (*og*) color mutations in tomato. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:11102–11107.

Sandmann, G. 2001. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: Strategies, problems and achievements. Trends Plant Sci. 6:14–17.

To, K. Y. and C. K. Wang. 2006. Molecular breeding of flower color. p.300–310. *in*: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues. Volume I. (Teixeira da Silva, J. A., ed.) Global Science Books. Isleworth. 571 pp.

Zhu, C, C. Bai, G. Sanahuja, D. Yuan, G. Farré, S. Naqvi, L. Shi, T. Capell, and P. Christou. 2010. The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. Arch. Biochem. Biophys. 504:132–141.

Zhu, C., S. Yamamura, H. Koiwa, M. Nishihara, and G. Sandmann. 2002. cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. Plant Mol. Biol. 48:277–285.

# 異體表達文心蘭 (南西) ζ-Carotene Desaturase 致使轉基因煙草胡蘿蔔素含量增加及葉型改變

李文立[1] 陳福旗[2,*]


## 摘要

李文立、陳福旗。2012。異體表達文心蘭 (南西) ζ-Carotene Desaturase 致使轉基因煙草胡蘿蔔素含量增加及葉型改變。台灣農業研究 62(2):93–105。

聚積胡蘿蔔素，具有亮黃色花朵的文心蘭 (南西) 是台灣重要的蘭花。為了瞭解胡蘿蔔素生合成中 ζ- 胡蘿蔔素脫氫酶 (ζ-carotene desaturase; *ZDS*) 的表達方式，我們選殖並分析了文心蘭 (南西) 的 ζ- 胡蘿蔔素脫氫酶。此關鍵酵素，*OncZDS* 具有 1,986 bp 核苷酸，5’ 和 3’ 未轉錄區 (untranslated regions; UTR) 分別是 68 與 226 個核苷酸。*OncZDS* 含有一個長 1,692 bp 的解讀框架 (open reading frame)，可以解碼成 563 個氨基酸的多肽 (polypeptide)，此多肽與其他植物具有 72.8–96.2% 的相似度。*OncZDS* 的相對表現量分析顯示，當花朵開放時，此基因的表現量逐漸增加至花朵半開時 (第 5 時期)。而異體表達此基因會造成轉基因煙草的葉形改變，並增加其總胡蘿蔔素的含量。


**關鍵詞**：文心蘭 (南西)、ζ- 胡蘿蔔素脫氫酶、選殖、基因表達、過量表達。

投稿日期：2012 年 8 月 29 日；接受日期：2013 年 4 月 22 日。

* 通訊作者：fchen@mail.npust.edu.tw

1 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所熱帶果樹系副研究員兼系主任。台灣 高雄市。

2 國立屏東科技大學植物科學研究所教授。台灣 屏東縣。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(2):106–125 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06202.02

# 不同水旱田農耕生態系統對田間雜草相變動之影響

蕭巧玲[1] 楊純明[2,*] 何佳勳[1]

## 摘要

蕭巧玲、楊純明、何佳勳。2013。不同水旱田農耕生態系統對田間雜草相變動之影響。台灣農業研究 62(2):106–125。

在不同耕作制度 (系統) 下，農地雜草相必將發生短期的變異與長期的變遷。為期瞭解雙期作水田農耕生態系 (paddy-paddy agro-ecosystem; PP) 及一期作水稻、二期作落花生之水旱田輪作農耕生態系 (paddy-upland rotation agro-ecosystem; PU) 下雜草相之變異與變遷，本研究乃於行政院農業委員會農業試驗所溪口農場之長期農業生態系研究 (long-term agricultural ecological research; LTER) 試驗場址進行雜草相調查。本報告為 2010 年至 2011 年之兩年試驗，調查與分析不同農耕生態系之雜草相變動情形。兩種農耕法分別包括慣行農耕 (conventional cropping system; CC) 及低投施農耕 (low-input cropping system; LC)，合計四種農耕生態系組合，即 PP-CC、PP-LC、PU-CC 及 PU-LC。根據調查結果，雜草密度在一期作 LC 處理區多於 CC 處理區，且 2011 年多於 2010 年，惟 LC 處理區雜草生質量在 2010 年小於 CC 區，而 2011 年卻大於 CC 區，推測農耕處理尚未使雜草相穩定故兩年間表現未趨一致。二期作的雜草相分布，PP 生態系大於 PU 生態系，以年際變化而言 2011 年少於 2010 年，顯示試區水田雜草相較旱田豐富且受到氣候影響。在四種農耕生態系中，一期作所發生的雜草科別數及種別數均少於二期作，惟年際間表現不一，可知影響雜草相之因子多而複雜。發生密度最多的雜草科別，雙期作皆為水田的 PP 生態系，一期作在 2010 年以千屈菜科最多、2011 年則為玄參科，二期作在兩年皆以玄參科密度最高。在水旱田輪作的 PU 生態系，一期作在 2010 年的 PU-CC 及 PU-LC 以菊科與千屈菜科分布較高，2011 年則為莎草科與菊科；二期作在 2010 年皆以菊科佔多數，而 2011 年之 PU-CC 與 PU-LC 則分別以菊科及茄科發生最多。進一步分析分布最多的雜草物種，PP 生態系 (PP-CC 及 PP-LC) 一期作在 2010 年以水莧菜、2011 年以母草最多，二期作兩年皆以母草最多。PU 生態系 (PU-CC 及 PU-LC) 於一期作在 2010 年由霍香薊、香附子分占一、二位，在 2011 年則為水莧菜及鱧腸，於二期作在 2010 年分別為霍香薊、鱧腸，2011 年則分別為香附子、燈籠草。顯然雜草的科別數及物種數將因為生態、農耕及氣象等條件的不同，呈現期作與年份上的變動，各生態系雜草相是否可以逐漸達到穩定狀態，則可能需要更多時間予以觀察、釐清。

**關鍵詞**：長期農業生態系、雙期作水田生態系、水旱田輪作生態系、慣行農耕、低投施農耕。

## 前言

雜草相的消長及變化，受農田內耕作方式影響甚大，包括耕犁、作物栽植時間與密度、雜草管理及施肥作業等連續或非連續的操作，都能將雜草群落重新組合，吾人則可藉由雜草相的組合來瞭解群落形成原因 (Moody 1996; Tungate *et al.* 2007; Ryan *et al.* 2010)。由此可見，農田的管理措施將使農田內雜草相發生變化及變遷，造成原因相當的複雜而多樣。因此，在不同農耕體系或制度下的經營管理措施，不僅必須考慮對作物的效應，亦應關注對當時雜草相的影響。舉例來說，未

投稿日期：2013 年 1 月 3 日；接受日期：2013 年 3 月 22 日。
* 通訊作者：cmyang@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所所長室/作物組研究員。台灣 台中市。

經耕作與曾經耕作的水稻田將有不同組成的雜草群落，有學者認爲雜草相的改變並非作物耕種的次數增加所造成，而係整地或水分管理不同引起 (Chiang & Leu 1982; Kent *et al.* 2001)；又如亞洲某些地區當以直播方式種植時，可使水稻田中的芒稷 (*Echinochloa colona*)、千金子 (*Leptochloa chinensis*) 等一年生禾本科雜草成爲優勢草種，取代移植稻田經常出現的鴨舌草 (*Monochoria vaginalis*)、細葉水丁香 (*Ludwigia hyssopifolia*) 等闊葉草 (Ho & Itoh 1991)。因此，對於不同的農耕生態系及農耕操作，應當長期調查農田的雜草相，以施予合適的雜草管理措施並避免生態環境的劣化。

農民常使用的輪作制度被認爲是有利於作物生產的生態型耕作方式，利用有系統的輪作，可使土壤養分更爲經濟有效的利用，前作殘留物耕犁入土後，除了增加有機質，也調節土壤養分、改善土壤理化性質及抑制雜草生長，並減少除草劑的施用 (Francis *et al.* 1989; Cheng 1997)。Cheng (1997) 的研究指出，水稻田經過 7 年輪作處理後，原來雙期作水田經過旱作的輪作而改善土壤理化性及雜草相。經過多年不同作物輪作後的水田，當恢復水稻種植之後，田區的尖葉雜草 (如禾草及莎草) 增加而闊葉雜草則明顯減少，顯示輪作所進行之栽培管理可利用於雜草的管理，其效果則視作物種植的前後順序、作物種類及田間除草劑選用類型等狀況而定 (Francis *et al.* 1989)。在 12 年的玉米-大豆輪作系統研究中，發現不耕犁組所調查的雜草種類歧異度高於慣行耕犁組，亦大於不同氮肥施用對雜草豐富度帶來的效應 (Lègére *et al.* 2008)。而且，輪作玉米時發現 15 種雜草種類，輪作大豆時則有 20 種雜草種類，其中鐵莧屬 (Acalypha) 等 8 種雜草未見於玉米田區，顯示雜草種類的分布會因爲不同的輪作作物對應之栽培管理或除草劑的施用類型而異 (Lègére *et al.* 2008)。因此，適當輪作系統除了可減少雜草對不同輪作作物的適應性外，亦能降低雜草種子再次循環投入土壤種子庫中 (Liebman & Dyck 1993; Smith & Gross 2006)。另一項長達 25 年輪作的試驗調查發現，有機農耕系統相較於慣行農耕系統具有較豐富的雜草相，作者並認爲維持多樣的雜草相不利於雜草管理 (Ryan *et al.* 2010)，因爲農田發生的雜草具有群體與社會結構，雖然成功防除其中某幾種雜草，新起優勢的其他雜草卻成爲新的問題雜草 (VanGessel 2001; Booth & Swanton 2002)。因此，有利於生態發展的農耕系統 (如有機農耕或低投入農耕)，必須長期動態調查雜草相的變化，才能施予適當的雜草管理，在維護生態的同時兼顧產量的考量。

綜合上述研究，農耕的多種操作措施將對農耕生態系造成深遠影響，所涉及的層面十分廣泛，對於週期循環變化的雜草而言，可能直接或間接影響雜草種類及密度的發展，而對農田的經營管理層面，則將牽涉作物與雜草間的競爭關係，並進而改變整個農田生物多樣性的維護。有鑑於此，本研究特別針對農業長期生態系試驗所設立的二大農耕生態系統的雜草相進行深入探討，本階段在於瞭解雙期作水田農耕生態系及一期作水稻、二期作落花生水旱輪作農耕生態系的雜草相變化及其差異。未來將持續追蹤不同農耕處理 / 操作下雜草相的長期變遷，期能提供評估建議予不同農耕生態系下雜草管理的參考，並助益於農耕系統的永續經營發展。

## 材料與方法

本試驗於行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所溪口農場之農業長期生態系試驗區進行，該試驗區分爲雙期作水田農耕生態系 (paddy-paddy agro-ecosystem; PP) 及一期作水稻、二期作落花生之水旱輪作農耕生態系 (paddy-upland rotation agro-ecosystem; PU) 兩大類農耕生態系，各生態系又分爲慣行農耕 (conventional cropping system; CC) 及低投施 (low-input cropping system; LC) 兩種耕作處理，合計有 PP-CC、PP-LC、PU-CC 及 PU-LC 四種農耕生態系 (或稱農耕系統) 組合。其

中，PU 生態系有 3 重複，每重複小區面積爲 0.6–0.8 ha，PP 生態系則爲 4 重複，每重複小區面積自 0.4–0.8 ha，分別在各區進行 2010 年一期作至 2011 年二期作的雜草相調查。

本試驗從 2010 年至 2011 年之栽培操作歷程列有耕犁 (tillage)、種植 (planting)、施肥 (fertilization)、噴藥 (herbicide spraying) 及收穫 (harvest) 等主要履歷 (表 1)。兩大農耕生態系在上半年的一期作皆栽植水稻，選用台南 11 號 (*Oryza sativa* L. cv. TN 11)；下半年二期作部分，PP 生態系仍栽植相同稻種，PU 生態系種植旱作落花生，選用台南 14 號 (*Arachis hypogaea* cv. Tainan 14)。肥料施用係以單質肥料硫酸銨 [$(NH_4)_2SO_4$]、過磷酸鈣 [主要爲 $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$，常以 $P_2O_5$ 表示]、氧化鉀 ($K_2O$) 來調配氮 (nitrogen; N)、磷 (phosphorus; P) 及鉀 (potassium; K) 三要素的比例。CC 之肥料用量採用行政院農業委員會所屬試驗改良場所推行之「合理化施肥」推薦量，並依土壤肥力調整施用劑量，LC 則爲 CC 部分施用量 (表 2)。PP 及 PU 農耕生態系的 CC 處理一期作之 3 種單質肥料分別投入 140：70：85 kg $ha^{-1}$，其中氮肥平均 (各爲 35 kg $ha^{-1}$) 分成基肥、第一次追肥、第二次追肥及穗肥等 4 次施用，全量磷肥 70 kg $ha^{-1}$ 在基肥階段施用，而全量鉀肥 85 kg $ha^{-1}$ 則於第二次追肥時施用；LC 以維持農田永續經營考量設計，肥料施用量依照土壤養分循環及土壤肥力狀態而定，約爲 CC 用量的 35–71% 不等 (表 2)。PP 農耕生態系的 CC 與 LC 處理二期作之 3 種單質肥料分別投入 120：60：60 kg $ha^{-1}$ 與 80：30：30 kg $ha^{-1}$，而 PU 生態系的 CC 與 LC 處理之 3 種單質肥分別投入 45：45：40 kg $ha^{-1}$ 與 20：15：15 kg $ha^{-1}$ (表 2)。

本試驗 2010 年的雜草管理在 4 個農耕生態系均採相同操作原則，2011 年種植水稻區域 (包含 PU 生態系一期作) 亦相同，惟二期作 PU 生態系略有不同，PU-CC 進行 1 次萌前除草劑，2 次萌後除草劑及 1 次人工除草管理，而 PU-LC 則進行相同除草劑管理外，並未施行人工除草，以比較雜草管理間之差異 (表 1)。PP 及 PU 在一期作水田耕種下，萌前除草劑 32% 丁基拉草乳劑 (butachlor，台灣庵原農藥股份有限公司 ) 在整地時以 1.6 a.i. L $ha^{-1}$ 施用量一併施用，萌後除草劑 5.1% 殺丹免速隆混合粒劑 (thiobencarb + bebsulfuron-methy，台灣庵原農藥股份有限公司) 於第一次追肥時期施用 1.53 kg a.i. $ha^{-1}$。PP 之二期作水田耕種施用的除草劑，與一期作水田耕種相同；PU 在二期作種植旱作落花生，乃於整地時施用萌前除草劑 34% 施得圃乳劑 (pendimethalin，安旺特有限公司) 0.68 a.i. L $ha^{-1}$ 及 45.1% 拉草乳劑 (alchlor，安旺特有限公司) 0.902 L a.i. $ha^{-1}$，再於播種後適當時機進行萌後雜草管理，分別施用相同的 3 種萌後除草劑，係將 44.1% 本達隆溶液 (bentazon，台聯實業股份有限公司 ) 0.441 L 1.i. $ha^{-1}$、34% 施得圃乳劑 (pendimethalin，安旺特有限公司) 0.85 L a.i. $ha^{-1}$ 及 5% 快伏草乳劑 (quizalofop-ethyl，台灣日產化工股份有限公司) 0.05 L a.i. $ha^{-1}$ 混合後噴施田間。

試區雜草種類與數量的調查，係自每一農耕生態系的重複小區中逢機取樣 4 點，每點面積 1 $m^2$，先計算各重複小區 4 點的平均值，再計算各農耕生態系全部小區的均值作爲代表值。各農耕生態系的試區，皆於收獲前數日進行取樣調查，先將 1 $m^2$ 面積內的所有雜草樣本拔取攜回研究室，經過清洗、分類後記錄雜草的科屬別、物種別，量測植株數量後得到密度 (plant $m^{-2}$)。續稱取其等鮮重，又經 80℃烘乾 72–96 h 後稱取乾重。試驗資料之統計分析採用 SAS 軟體 (version 9.1, SAS Institute)，繪圖軟體則採用 Sigmaplot (version 8.0, SPSS ASC BV, The Netherlands)。除了各農耕生態系的均值，亦計算其機差 (或稱標準誤，standard error; SE) 及雜草出現百分比 (%)，後者係指每一農耕生態系中該雜草科別或種別出現之百分比，公式如下列：

表 1. 2010 年及 2011 年合計兩年四期作不同農耕生態系之栽培操作歷程。

**Table 1.** Tracing of cultural practices in the first and the second cropping seasons of 2010 and 2011.

| | Paddy-paddy agro-ecosystem (PP) | | Paddy-upland rotation agro-ecosystem (PU) | |
|---|---|---|---|---|
| Practice | CC[y] | LC | CC | LC |
| First Crop[z] | | | | |
| Tillage | 01/28/2010<br>01/22/2011 | 01/28/2010<br>01/22/2011 | 01/28/2010<br>01/22/2011 | 01/28/2010<br>01/22/2011 |
| Planting | 02/03/2010<br>01/30/2011 | 02/03/2010<br>01/30/2011 | 02/03/2010<br>01/30/2011 | 02/03/2010<br>01/30/2011 |
| Fertilization, basal dressing | 01/25/2010<br>01/20/2011 | 01/25/2010<br>01/20/2011 | 01/25/2010<br>01/20/2011 | 01/25/2010<br>01/20/2011 |
| 1st top dressing | 02/24/2010<br>02/10/2011 | 02/24/2010<br>02/10/2011 | 02/24/2010<br>02/10/2011 | 02/24/2010<br>02/10/2011 |
| 2nd top dressing | 03/09/2010<br>03/15/2011 | 03/09/2010<br>03/15/2011 | 03/09/2010<br>03/15/2011 | 03/09/2010<br>03/15/2011 |
| Last dressing | 04/01/2010<br>05/05/2011 | 04/01/2010<br>05/05/2011 | 04/01/2010<br>05/05/2011 | 04/01/2010<br>05/05/2011 |
| Herbicide, pre-emergence | 01/27/2010<br>01/14/2011 | 01/27/2010<br>01/14/2011 | 01/27/2010<br>01/14/2011 | 01/27/2010<br>01/14/2011 |
| post-emergence | 02/24/2010<br>02/10/2011 | 02/24/2010<br>02/10/2011 | 02/24/2010<br>02/10/2011 | 02/24/2010<br>02/10/2011 |
| Harvest | 06/23/2010<br>07/04/2011 | 06/23/2010<br>07/04/2011 | 06/23/2010<br>07/04/2011 | 06/23/2010<br>07/04/2011 |
| Second Crop | | | | |
| Tillage | 07/30/2010<br>07/25/2011 | 07/30/2010<br>07/25/2011 | 08/17/2010<br>08/17/2011 | 08/17/2010<br>08/17/2011 |
| Planting | 08/04/2010<br>07/29/2011 | 08/04/2010<br>07/29/2011 | 08/19/2010<br>08/19/2011 | 08/19/2010<br>08/19/2011 |
| Fertilization, basal dressing | 07/22/2010<br>07/25/2011 | 07/22/2010<br>07/25/2011 | 08/16/2010<br>08/19/2011 | 08/16/2010<br>08/19/2011 |
| 1st top dressing | 08/12/2010<br>08/11/2011 | 08/12/2010<br>08/11/2011 | 10/26/2010<br>10/12/2011 | 10/26/2010<br>10/12/2011 |
| 2nd top dressing | 08/24/2010<br>08/25/2011 | 08/24/2010<br>08/25/2011 | None/2010<br>None/2011 | None/2010<br>None/2011 |
| Last dressing | 09/27/2010<br>09/28/2011 | 09/27/2010<br>09/28/2011 | None/2010<br>None/2011 | None/2010<br>None/2011 |
| Herbicide, pre-emergence | 07/29/2010<br>07/25/2011 | 07/29/2010<br>07/25/2011 | 08/20/2010<br>08/22/2011 | 08/20/2010<br>08/22/2011 |
| post-emergence-1 | 08/12/2010<br>08/11/2011 | 08/12/2010<br>08/11/2011 | 09/06/2010<br>09/07/2011 | 09/06/2010<br>09/07/2011 |
| post-emergence-2 | None/2010<br>None/2011 | None/2010<br>None/2011 | None/2010<br>09/20/2011 | None/2010<br>09/20/2011 |
| Hand-weeding | None/2010<br>None/2011 | None/2010<br>None/2011 | 10/15/2010<br>09/23/2011 | 10/15/2010<br>None/2011 |
| Harvest | 12/05/2010<br>11/24/2011 | 12/05/2010<br>11/24/2011 | 12/22/2010<br>12/08/2011 | 12/22/2010<br>12/08/2011 |

[z] Rice was planted in both PP and PU agro-ecosystems in First Crop; whereas, it was rice for PP and peanut for PU in Second Crop.
[y] CC: conventional cropping system; LC: low-input cropping system.

表 2. 2010 年及 2011 年一、二期作各農耕生態系使用之肥料及除草劑情形。

**Table 2.** The summary of field treatments for experiments conducted in the first and the second cropping seasons of 2010 and 2011.

| | Paddy-paddy agro-ecosystem (PP) | | Paddy-upland rotation agro-ecosystem (PU) | |
|---|---|---|---|---|
| Practice | CC[y] | LC | CC | LC |
| First Crop[z] | | | | |
| Fertilizers (kg ha$^{-1}$) N:P:K[x] | 140:70:85 | 100:30:30 | 140:70:85 | 100:30:30 |
| Herbicides, pre-emergence | 32% butachlor | 32% butachlor | 32% butachlor | 32% butachlor |
| post-emergence | 5.1% benthiocarb + bensulfuron-methyl | 5.1% benthiocarb + bensulfuron-methyl | 5.1% benthiocarb + bensulfuron-methyl | 5.1% benthiocarb + bensulfuron-methyl |
| Second Crop | | | | |
| Fertilizers (kg ha$^{-1}$) N:P:K | 120:60:60 | 80:30:30 | 45:45:50 | 20:15:15 |
| Herbicides, per-emergence | 32% butachlor | 32% butachlor | 5.1% alachlor + 34% pendimethalin | 5.1% alachlor + 34% pendimethalin |
| post-emergence | 5.1% benthiocarb + bensulfuron-methyl | 5.1% benthiocarb + bensulfuron-methyl | 44.1% bentazone + 34% pendimethalin + 5% quizalofop-ethyl | 44.1% bentazone + 34% pendimethalin + 5% quizalofop-ethyl |

[z] Rice was planted in both PP and PU agro-ecosystems in First Crop; whereas, it was rice for PP and peanut for PU in Second Crop.
[y] CC: conventional cropping system; LC: low-input cropping system.
[x] The input of fertilizers ammonium sulfate [$(NH_4)_2SO_4$], calcium superphosphate [mainly $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$] and potassium oxide ($K_2O$), demoted as N : P : K, are to ajust the ratio of three macroelements nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K).

$$\text{雜草出現百分比 (\%)} = \frac{\text{該雜草科別或種類之株數}}{\text{所有雜草科別或種類之株數總和}} \times 100\%$$

## 結果

本研究於本所嘉義分所溪口農場之長期農業生態系研究站進行，針對 2010 年及 2011 年之一、二期作雜草調查資料，探討不同農耕生態系對雜草相變動之影響。整理 4 種農耕生態系發生之雜草科別及發生密度 (表 3)，一期作水稻栽植區較高肥料量之 CC 區平均雜草發生量在 2010 年爲 6 plant m$^{-2}$ (PP 生態系 1.8 plant m$^{-2}$、PU 9.9 plant m$^{-2}$)，2011 年則爲 16 plant m$^{-2}$。而低施肥量之 LC 區在 2010 年爲 4 plant m$^{-2}$，2011 年則爲 21 plant m$^{-2}$。整體而言，一期作 LC 區雜草密度多於 CC 區，且 2011 年多於 2010 年。二期作的雜草相分布，PP 生態系大於 PU 生態系，以年際變化而言 2011 年少於 2010 年，PU 生態系雜草相在 2 年間消長變化較小 (表 3)。進一步分析各農耕生態系田區的雜草生質量 (鮮重、乾重) 之差異 (表 4、表 5)，結果發現大致上 2011 年大於 2010 年，2010 年呈現 CC 區大於 LC 區，而 2011 年則以 LC 區多於 CC 區，兩年間表現未趨一致。

其次，關於田區發生雜草之科別數與種別數消長 (圖 1)，可發現一期作中不論科別數與種別數，2011 年皆多於 2010 年，惟二期作呈現相反趨勢。綜合調查資料，2010 年共發生 17 科雜草，2011 年則有 19 科草相分布，即在二期作 PU-LC 生態系中增加了梧桐科 (Sterculiaceae) 與田麻科 (Tiliaceae) 等 2 科 (表 3)。除此之外，大致呈現二期作科別數與種別數高於一期作，PU 生態系略多於 PP 生態系，而 CC 處理多於 LC 處理之趨勢。

進一步整理不同農耕生態系中發生密度最多之前 5 名科別，一期作 PP 及 PU 生態系多屬水田雜草相 (圖 2)，2010 年 PP 生態系以千屈菜科 (Lythracese) 所佔密度最高，平均發生約 19 plant m$^{-2}$，有 85% 雜草爲此科植物，而玄參科 (Scrophulariaceae) 雜草僅佔 7% 左右，平均約 1–2 plant m$^{-2}$ 分佈。2011 年有大幅增加的現象，平均最多有 247 plant m$^{-2}$ 分布，田區中有 80% 之族群屬於玄參科雜草。

表 3. 2010 年及 2011 年一、二期作各農耕生態系所分布之雜草科別數。

**Table 3.** The weed family distribution and its density in various cropping systems in the first and the second copping seasons of 2010 and 2011.

| | | Frist crop[z] | | | | | | | | Second crop | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PP | | | | PU | | | | PP | | | | PU | | | | |
| | | CC[y] | | LC | | CC | | LC | | CC | | LC | | CC | | LC | | |
| Family | Year | plant $m^{-2}$ (%) | | | | | | | | | | | | | | | | Mean |
| Amaeanthaceae | 2010 | 1.0 | (7.9) | 0.4 | (2.0) | 0.3 | (0.3) | 0.1 | (0.3) | 0.4 | (0.1) | 0.8 | (0.3) | 0.1 | (0.2) | 1.1 | (0.9) | 0.5 |
| | 2011 | 1.6 | (0.5) | 0.2 | (0.1) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.2 |
| Chenopodiaceae | 2010 | -[x] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1 | (0.1) | 0.1 | (0.1) | < 0.1 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0 |
| Commelinaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | 0.2 | (0.6) | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Compositae | 2010 | 0.1 | (1.0) | - | - | 34.8 | (35.3) | 5.2 | (17.3) | 1.1 | (0.3) | 0.5 | (0.2) | 55.7 | (72.9) | 67.9 | (53.3) | 20.7 |
| | 2011 | 1.1 | (0.3) | - | - | 11.2 | (22.3) | 14.7 | (26.4) | 15.3 | (12.3) | 4.2 | (3.5) | 31.6 | (36.1) | 6.8 | (7.3) | 10.6 |
| Convolvulaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1 | (< 0.1) | - | - | 0.9 | (1.2) | 2.4 | (1.9) | 0.4 |
| | 2011 | 0.2 | (0.1) | - | - | 0.4 | (0.8) | 0.2 | (0.3) | - | - | - | - | 0.6 | (0.7) | 16.3 | (17.7) | 2.2 |
| Cruciferae | 2010 | - | - | - | - | 1.3 | (1.4) | - | - | 58.1 | (15.4) | 8.9 | (3.6) | 2.3 | (3.0) | 2.5 | (1.9) | 9.1 |
| | 2011 | 0.9 | (0.3) | - | - | 1.1 | (2.2) | 0.6 | (1.1) | 0.1 | (0.1) | - | - | 3.0 | (3.4) | 0.3 | (0.3) | 0.8 |
| Cyperaceae | 2010 | 0.2 | (1.5) | 0.5 | (2.3) | 11.2 | (11.3) | 8.3 | (27.7) | 59.6 | (15.8) | 47.1 | (19.1) | 6.0 | (7.8) | 7.5 | (5.9) | 17.5 |
| | 2011 | 36.2 | (11.7) | 63.9 | (25.6) | 14.3 | (28.6) | 14.2 | (25.5) | 11.8 | (9.5) | 11.4 | (9.6) | 31.1 | (35.6) | 2.2 | (2.4) | 23.1 |
| Gramineae | 2010 | 2.1 | (16.8) | 0.8 | (3.7) | 1.4 | (1.4) | 1.0 | (3.4) | 2.6 | (0.7) | 0.8 | (0.3) | 1.0 | (1.3) | 0.2 | (0.1) | 1.2 |
| | 2011 | 2.9 | (0.9) | 3.3 | (1.3) | 0.2 | (0.3) | 3.5 | (6.3) | 1.1 | (0.9) | 2.6 | (2.2) | 0.9 | (1.0) | 3.7 | (4.0) | 2.3 |
| LeguminoLCe | 2010 | 0.1 | (0.5) | - | - | 0.3 | (0.3) | 0.3 | (0.8) | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1 |
| | 2011 | - | - | - | - | 0.2 | (0.3) | - | - | - | - | - | - | 0.2 | (0.2) | - | - | 0.1 |
| Lythraceae | 2010 | 8.3 | (65.4) | 18.6 | (84.6) | 18.2 | (18.4) | 9.8 | (32.7) | 49.0 | (13.0) | 85.5 | (34.8) | 0.3 | (0.4) | 4.5 | (3.5) | 24.3 |
| | 2011 | 14.7 | (4.7) | 24.2 | (9.7) | 11.8 | (23.5) | 12.8 | (23.1) | 25.5 | (20.6) | 26.2 | (22.1) | 0.3 | (0.4) | 0.6 | (0.6) | 14.5 |
| Onagraceae | 2010 | - | - | - | - | 0.1 | (0.1) | - | - | 4.3 | (1.1) | 4.2 | (1.7) | 0.4 | (0.6) | 4.1 | (3.2) | 1.6 |
| | 2011 | 5.4 | (1.8) | 0.6 | (0.3) | 0.7 | (1.3) | 0.3 | (0.6) | 0.2 | (0.2) | 0.1 | (0.1) | 0.3 | (0.4) | - | - | 1.0 |
| Polygonaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.6 | (0.7) | 5.0 | (3.9) | 0.7 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0 |
| Pontederiaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1 | (< 0.1) | - | - | - | - | - | - | < 0.1 |

表 3.　2010 年及 2011 年一、二期作各農耕生態系所分布之雜草科別數。(續)

**Table 3.** The weed family distribution and its density in various cropping systems in the first and the second copping seasons of 2010 and 2011. (continued)

| | | Frist crop[z] | | | | | | | | Second crop | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PP | | | | PU | | | | PP | | | | PU | | | | |
| | | CC[y] | | LC | | CC | | LC | | CC | | LC | | CC | | LC | | |
| Family | Year | plant $m^{-2}$ (%) | | | | | | | | | | | | | | | | Mean |
| | 2011 | 0.3 | (0.1) | - | - | - | - | - | - | 0.1 | (0.1) | - | - | - | - | - | - | 0.1 |
| Rubiaceae | 2010 | -[x] | - | - | - | - | - | - | - | 3.0 | (0.8) | 2.0 | (0.8) | 0.1 | (0.1) | 1.4 | (1.1) | 0.8 |
| | 2011 | 0.3 | (0.1) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.6 | (0.7) | - | - | 0.1 |
| Scrophulariaceae | 2010 | 0.9 | (6.9) | 1.6 | (7.4) | 22.7 | (23.0) | 3.5 | (11.7) | 176.8 | (46.8) | 96.0 | (39.0) | 4.2 | (5.5) | 24.5 | (19.3) | 41.3 |
| | 2011 | 247.1 | (79.6) | 157.7 | (63.1) | 5.5 | (11.0) | 4.3 | (7.7) | 67.6 | (54.7) | 73.3 | (62.0) | 1.4 | (1.6) | 1.7 | (1.8) | 69.8 |
| Solanaceae | 2010 | - | - | - | - | 8.5 | (8.6) | 1.7 | (5.6) | 0.3 | (0.1) | 0.3 | (0.1) | 4.9 | (6.4) | 6.1 | (4.8) | 2.7 |
| | 2011 | - | - | 0.1 | (0.1) | 4.3 | (8.7) | 1.4 | (2.6) | - | - | - | - | 16.9 | (19.4) | 60.6 | (65.7) | 10.4 |
| Sterculiaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1 | (0.1) | < 0.1 |
| Tiliaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1 | (0.1) | < 0.1 |
| Unknown | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | 22.3 | (5.9) | - | - | - | - | - | - | 2.8 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.3 | (0.2) | 0.5 | (0.6) | - | - | 0.1 |
| Mean | 2010 | 1.8 ± 2.9 | | 4.4 ± 7.9 | | 9.9 ± 11.9 | | 3.3 ± 3.7 | | 29.1 ± 50.1 | | 24.6 ± 37.7 | | 6.7 ± 16.8 | | 10.1 ± 18.5 | | 11.2 ± 10.1 |
| | 2011 | 28.2 ± 73.4 | | 35.7 ± 58.6 | | 4.6 ± 5.4 | | 5.6 ± 5.9 | | 13.7 ± 22.1 | | 14.8 ± 25.3 | | 7.3 ± 12.2 | | 9.2 ± 18.7 | | 14.9 ± 11.3 |

[z] Rice was planted in both PP (paddy-paddy agro-ecosystem) and PU (paddy-upland rotation agro-ecosystem) in First Crop; whereas, it was rice for PP and peanut for PU in Second Crop.

[y] CC: conventional cropping system; LC: low-input croopping system.

[x] Not recorded.

表 4. 2010 年及 2011 年一、二期作各農耕生態系不同雜草科別之鮮重。

**Table 4.** The weed family distribution and its fresh weight in various cropping systems in the first and the second of 2010 and 2011.

| | | Frist crop[z] | | | | | | | | Second crop | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PP | | | | PU | | | | PP | | | | PU | | | | |
| | | CC[y] | | LC | | CC | | LC | | CC | | LC | | CC | | LC | | |
| Family | Year | g m$^{-2}$ (%) | | | | | | | | | | | | | | | | Mean |
| Amaeanthaceae | 2010 | 1.2 | (12.2) | 0.2 | (5.8) | 0.1 | (0.2) | 0.0 | (< 0.1) | 0.1 | (0.4) | 0.1 | (0.4) | 0.2 | (0.2) | 1.6 | (1.2) | 0.4 |
| | 2011 | 1.3 | (0.8) | 0.1 | (< 0.1) | 1.9 | (4.5) | 8.1 | (12.1) | 1.7 | (1.8) | 0.3 | (0.3) | - | - | - | - | 1.7 |
| Chenopodiaceae | 2010 | -[x] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 | (< 0.1) | < 0.1 | (< 0.1) | < 0.1 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Commelinaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | 0.1 | (0.5) | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0 |
| Compositae | 2010 | < 0.1 | (0.3) | - | - | 28.7 | (57.3) | 9.3 | (36.5) | 0.1 | (0.5) | 0.1 | (0.4) | 66.8 | (65.2) | 94.4 | (70.3) | 24.9 |
| | 2011 | 1.1 | (0.7) | - | - | 21.3 | (51.3) | 25.2 | (37.6) | 7.5 | (7.9) | 7.7 | (7.5) | 97.8 | (27.2) | 24.4 | (2.4) | 23.1 |
| Convolvulaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1 | (0.3) | - | - | 3.0 | (2.9) | 3.9 | (2.9) | 0.9 |
| | 2011 | 0.1 | (0.1) | - | - | 0.2 | (0.6) | 0.4 | (0.5) | - | - | - | - | 5.6 | (1.6) | 127.8 | (12.7) | 16.8 |
| Cruciferae | 2010 | - | - | - | - | 0.1 | (0.2) | - | - | 0.5 | (1.8) | 0.1 | (0.7) | 3.0 | (2.9) | 2.2 | (1.6) | 0.7 |
| | 2011 | < 0.1 | (< 0.1) | - | - | 0.3 | (0.7) | 0.2 | (0.3) | < 0.1 | (< 0.1) | - | - | 1.5 | (0.4) | 0.1 | (< 0.1) | 0.3 |
| Cyperaceae | 2010 | 0.4 | (3.7) | 0.4 | (10.5) | 5.7 | (11.4) | 6.1 | (24.0) | 5.0 | (18.6) | 6.5 | (34.9) | 2.8 | (2.7) | 3.9 | (2.9) | 3.8 |
| | 2011 | 34.2 | (21.7) | 59.3 | (39.2) | 10.3 | (24.9) | 17.3 | (25.8) | 11.1 | (11.7) | 15.3 | (14.9) | 31.9 | (8.9) | 3.6 | (0.4) | 22.9 |
| Gramineae | 2010 | 4.6 | (46.2) | 1.3 | (37.4) | 1.6 | (3.2) | 3.3 | (13.2) | 0.2 | (0.8) | 0.1 | (0.8) | 0.7 | (0.7) | 0.1 | (0.1) | 1.5 |
| | 2011 | 1.3 | (0.8) | 5.0 | (3.3) | 0.2 | (0.4) | 9.2 | (13.7) | 1.2 | (1.3) | 10.4 | (10.1) | 0.6 | (0.2) | 11.1 | (1.1) | 4.9 |
| Leguminosae | 2010 | 0.3 | (3.3) | - | - | < 0.1 | (0.1) | < 0.1 | (0.1) | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 |
| | 2011 | - | - | - | - | 0.1 | (0.2) | - | - | - | - | - | - | < 0.1 | (< 0.1) | - | - | < 0.1 |
| Lythraceae | 2010 | 2.5 | (24.8) | 1.2 | (33.7) | 2.1 | (4.3) | 4.8 | (18.8) | 3.0 | (11.3) | 5.1 | (27.8) | < 0.1 | (< 0.1) | 0.8 | (0.6) | 2.4 |
| | 2011 | 6.9 | (4.4) | 8.5 | (5.6) | 3.0 | (7.2) | 2.6 | (3.8) | 24.4 | (25.7) | 19.3 | (19.3) | 0.1 | (< 0.1) | 1.5 | (0.1) | 8.3 |
| Onagraceae | 2010 | - | - | - | - | 0.1 | (0.1) | - | - | 0.3 | (1.1) | 0.4 | (2.1) | 0.2 | (0.2) | 0.9 | (0.7) | 0.2 |
| | 2011 | 7.8 | (5.0) | 0.4 | (0.3) | 1.1 | (2.5) | 0.6 | (0.9) | 1.4 | (1.5) | 0.1 | (0.1) | 0.1 | (< 0.1) | - | - | 1.4 |

[z] Rice was planted in both PP (paddy-paddy agro-ecosystem) and PU (paddy-upland rotation agro-eco system) in First Crop; whereas, it was rice for PP and peanut for PU in Second Crop.
[y] CC: conventional cropping system; LC: low-input croopping system.
[x] Not recorded.

表 4. 2010 年及 2011 年一、二期作各農耕生態系不同雜草科別之鮮重。(續)

**Table 4.** The weed family distribution and its fresh weight in various cropping systems in the first and the second of 2010 and 2011. (continued)

| Family | Year | Frist crop[z] PP CC[y] | Frist crop[z] PP LC | Frist crop[z] PU CC | Frist crop[z] PU LC | Second crop PP CC | Second crop PP LC | Second crop PU CC | Second crop PU LC | Mean |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | g m$^{-2}$ (%) | | | | | | | | |
| Polygonaceae | 2010 | - - | - - | - - | - - | - - | - - | < 0.1 (< 0.1) | 0.9 (0.7) | 0.1 |
| | 2011 | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | 0.0 |
| Pontederiaceae | 2010 | - - | - - | - - | - - | < 0.1 (< 0.1) | - - | - - | - - | < 0.1 |
| | 2011 | 0.7 (0.4) | - - | - - | - - | 0.1 (0.1) | - - | - - | - - | 0.1 |
| Rubiaceae | 2010 | -[x] - | - - | - - | - - | 0.1 (0.2) | < 0.1 (0.2) | < 0.1 (< 0.1) | 0.1 (0.1) | < 0.1 |
| | 2011 | < 0.1 (< 0.1) | - - | - - | - - | - - | - - | < 0.1 (< 0.1) | - - | < 0.1 |
| Scrophulariaceae | 2010 | 0.9 (9.4) | 0.4 (12.5) | 7.4 (14.8) | 1.2 (4.7) | 16.0 (59.6) | 6.0 (32.7) | 0.7 (0.7) | 4.6 (3.4) | 4.7 |
| | 2011 | 104.2 (66.1) | 78.0 (51.6) | 1.9 (4.5) | 3.4 (5.0) | 47.5 (50.0) | 49.0 (47.8) | 0.6 (0.2) | 0.6 (0.1) | 35.7 |
| Solanaceae | 2010 | - - | - - | 4.2 (8.4) | 0.6 (2.2) | 0.1 (0.2) | < 0.1 (0.1) | 25.1 (24.5) | 20.9 (15.6) | 6.4 |
| | 2011 | - - | < 0.1 (< 0.1) | 1.3 (3.2) | 0.2 (0.2) | - - | - - | 221.1 (61.5) | 832.7 (83.1) | 131.9 |
| Sterculiaceae | 2010 | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | 0.0 |
| | 2011 | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | 0.5 (0.1) | 0.1 |
| Tiliaceae | 2010 | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | 0.0 |
| | 2011 | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | 0.3 (< 0.1) | < 0.1 |
| Unknown | 2010 | - - | - - | - - | - - | 1.4 (5.2) | - - | - - | - - | 0.2 |
| | 2011 | - - | - - | - - | - - | - - | < 0.1 (< 0.1) | 0.1 (< 0.1) | - - | < 0.1 |
| Mean | 2010 | 1.4 ± 1.6 | 0.7 ± 0.5 | 5.0 ± 8.7 | 2.8 ± 3.3 | 2.1 ± 4.4 | 1.9 ± 2.8 | 8.9 ± 21.4 | 10.3 ± 25.9 | 4.13 ± 3.6 |
| | 2011 | 14.3 ± 31.4 | 21.6 ± 32.7 | 3.8 ± 6.5 | 6.7 ± 8.5 | 10.6 ± 16.0 | 12.8 ± 16.4 | 30.0 ± 66.6 | 100.2 ± 260.3 | 25.0 ± 31.5 |

[z] Rice was planted in both PP (paddy-paddy agro-ecosystem) and PU (paddy-upland rotation agro-eco system) in First Crop; whereas, it was rice for PP and peanut for PU in Second Crop.

[y] CC: conventional cropping system; LC: low-input croopping system.

[x] Not recorded.

表 5. 2010 年及 2011 年一、二期作各農耕生態系不同雜草科別之乾重。

**Table 5.** The weed family distribution and its dry weight in various cropping systems in the first and the second of 2010 and 2011.

| | | Frist crop[z] | | | | | | | | Second crop | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PP | | | | PU | | | | PP | | | | PU | | | | |
| | | CC[y] | | LC | | CC | | LC | | CC | | LC | | CC | | LC | | |
| Family | Year | g m$^{-2}$ (%) | | | | | | | | | | | | | | | | Mean |
| Amaeanthaceae | 2010 | 0.2 | (8.4) | < 0.1 | (4.1) | < 0.1 | (0.2) | < 0.1 | (< 0.1) | < 0.1 | (0.8) | < 0.1 | (0.4) | < 0.1 | (0.1) | 0.2 | (1.2) | 0.1 |
| | 2011 | 0.3 | (1.0) | < 0.1 | (< 0.1) | 0.4 | (3.8) | 1.3 | (8.9) | 0.3 | (1.6) | < 0.1 | (0.2) | - | - | - | - | 0.3 |
| Chenopodiaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 | (< 0.1) | < 0.1 | (< 0.1) | < 0.1 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0 |
| Commelinaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | < 0.1 | (0.4) | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0 |
| Compositae | 2010 | < 0.1 | (0.2) | - | - | 3.3 | (52.6) | 1.2 | (27.2) | < 0.1 | (0.7) | < 0.1 | (0.3) | 8.1 | (66.9) | 14.5 | (72.7) | 3.4 |
| | 2011 | 0.3 | (1.1) | - | - | 5.4 | (50.1) | 4.6 | (32.1) | 1.1 | (6.4) | 1.2 | (5.7) | 10.9 | (27.6) | 3.6 | (2.5) | 3.4 |
| Convolvulaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 | (0.7) | - | - | 0.5 | (4.5) | 0.6 | (3.2) | 0.1 |
| | 2011 | 0.1 | (0.2) | - | - | 0.1 | (0.7) | 0.1 | (0.6) | - | - | - | - | 0.9 | (2.3) | 26.1 | (18.1) | 3.4 |
| Cruciferae | 2010 | - | - | - | - | < 0.1 | (0.3) | - | - | 0.1 | (2.5) | < 0.1 | (0.8) | 0.3 | (2.8) | 0.3 | (1.4) | 0.1 |
| | 2011 | < 0.1 | (< 0.1) | - | - | 0.1 | (0.6) | < 0.1 | (0.3) | < 0.1 | (< 0.1) | - | - | 0.2 | (0.4) | < 0.1 | (< 0.1) | < 0.1 |
| Cyperaceae | 2010 | 0.1 | (3.3) | 0.1 | (8.8) | 1.2 | (18.7) | 1.4 | (31.8) | 0.7 | (25.1) | 1.4 | (41.2) | 0.6 | (5.2) | 1.0 | (5.3) | 0.8 |
| | 2011 | 6.9 | (23.7) | 15.1 | (44.1) | 3.2 | (29.8) | 4.4 | (30.7) | 2.7 | (15.4) | 3.9 | (18.8) | 5.9 | (14.9) | 1.0 | (0.7) | 5.4 |
| Gramineae | 2010 | 1.1 | (58.4) | 0.4 | (47.0) | 0.2 | (3.9) | 0.9 | (19.5) | < 0.1 | (1.4) | < 0.1 | (1.1) | 0.1 | (1.2) | < 0.1 | (0.1) | 0.3 |
| | 2011 | 0.4 | (1.5) | 1.4 | (4.1) | < 0.1 | (0.3) | 2.5 | (17.3) | 0.3 | (1.9) | 2.3 | (11.2) | 0.1 | (0.3) | 3.3 | (2.3) | 1.3 |
| Leguminosae | 2010 | < 0.1 | (2.3) | - | - | < 0.1 | (0.1) | < 0.1 | (0.1) | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 |
| | 2011 | - | - | - | - | < 0.1 | (0.2) | - | - | - | - | - | - | < 0.1 | (< 0.1) | - | - | < 0.1 |
| Lythraceae | 2010 | 0.4 | (20.6) | 0.3 | (32.8) | 0.3 | (4.5) | 0.7 | (16.4) | 0.4 | (15.5) | 0.9 | (27.9) | < 0.1 | (< 0.1) | 0.1 | (0.6) | 0.4 |
| | 2011 | 1.7 | (6.0) | 2.2 | (6.5) | 0.8 | (7.2) | 0.7 | (4.6) | 5.9 | (33.8) | 5.2 | (25.1) | < 0.1 | (< 0.1) | 0.4 | (0.3) | 2.1 |
| Onagraceae | 2010 | - | - | - | - | < 0.1 | (0.5) | - | - | < 0.1 | (1.4) | 0.1 | (1.7) | < 0.1 | (0.3) | 0.2 | (0.9) | < 0.1 |
| | 2011 | 1.9 | (6.5) | 0.1 | (0.3) | 0.2 | (2.2) | 0.2 | (1.4) | 0.3 | (1.9) | < 0.1 | (0.1) | < 0.1 | (0.1) | - | - | 0.3 |

[z] Rice was planted in both PP (paddy-paddy agro-ecosystem) and PU (paddy-upland rotation agro-ecosystem) in First Crop; whereas, it was rice for PP and peanut for PU in Second Crop.

[y] CC: conventional cropping system; LC: low-input croopping system

[x] Not recorded.

表 5. 2010 年及 2011 年一、二期作各農耕生態系不同雜草科別之乾重。(續)

**Table 5.** The weed family distribution and its dry weight in various cropping systems in the first and the second of 2010 and 2011. (continued)

| Family | Year | Frist crop[z] | | | | | | | | Second crop | | | | | | | | Mean |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PP | | | | PU | | | | PP | | | | PU | | | | |
| | | CC[y] | | LC | | CC | | LC | | CC | | LC | | CC | | LC | | |
| | | g m$^{-2}$ (%) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Polygonaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 | (< 0.1) | 0.1 | (0.7) | < 0.1 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0 |
| Pontederiaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 | (< 0.1) | - | - | - | - | - | - | < 0.1 |
| | 2011 | 0.1 | (0.3) | - | - | - | - | - | - | < 0.1 | (0.1) | - | - | - | - | - | - | < 0.1 |
| Rubiaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 | (0.4) | < 0.1 | (0.3) | < 0.1 | (< 0.1) | < 0.1 | (0.2) | < 0.1 |
| | 2011 | < 0.1 | (< 0.1) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 | (< 0.1) | - | - | < 0.1 |
| Scrophulariaceae | 2010 | 0.1 | (6.9) | 0.1 | (7.4) | 0.9 | (14.4) | 0.2 | (3.5) | 1.3 | (46.7) | 0.9 | (26.3) | 0.1 | (0.9) | 0.8 | (4.1) | 0.5 |
| | 2011 | 17.4 | (59.8) | 15.4 | (45.0) | 0.4 | (3.4) | 0.5 | (3.7) | 6.7 | (38.9) | 8.1 | (38.9) | 0.1 | (0.1) | 0.1 | (0.1) | 6.1 |
| Solanaceae | 2010 | - | - | - | - | 0.3 | (4.9) | 0.1 | (1.1) | < 0.1 | (0.2) | < 0.1 | (0.1) | 2.2 | (18.0) | 2.0 | (9.8) | 0.6 |
| | 2011 | - | - | < 0.1 | (< 0.1) | 0.2 | (1.7) | < 0.1 | (0.3) | - | - | - | - | 21.4 | (54.2) | 109.5 | (76.0) | 16.4 |
| Sterculiaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1 | (0.1) | < 0.1 |
| Tiliaceae | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1 | (< 0.1) | < 0.1 |
| Unknown | 2010 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1 | (4.7) | - | - | - | - | - | - | < 0.1 |
| | 2011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | < 0.1 | (< 0.1) | < 0.1 | (< 0.1) | - | - | < 0.1 |
| Mean | 2010 | 0.3 ± 0.4 | | 0.2 ± 0.1 | | 0.6 ± 1.0 | | 0.5 ± 0.6 | | 0.2 ± 0.4 | | 0.3 ± 0.5 | | 1.0 ± 2.5 | | 1.5 ± 3.9 | | 0.6 ± 0.5 |
| | 2011 | 2.6 ± 5.3 | | 5.7 ± 7.5 | | 1.0 ± 1.7 | | 1.4 ± 1.8 | | 1.9 ± 2.6 | | 2.6 ± 3.0 | | 3.3 ± 6.6 | | 14.4 ± 34.3 | | 4.1 ± 4.4 |

[z] Rice was planted in both PP (paddy-paddy agro-ecosystem) and PU (paddy-upland rotation agro-ecosystem) in First Crop; whereas, it was rice for PP and peanut for PU in Second Crop.

[y] CC: conventional cropping system; LC: low-input croopping system

[x] Not recorded.

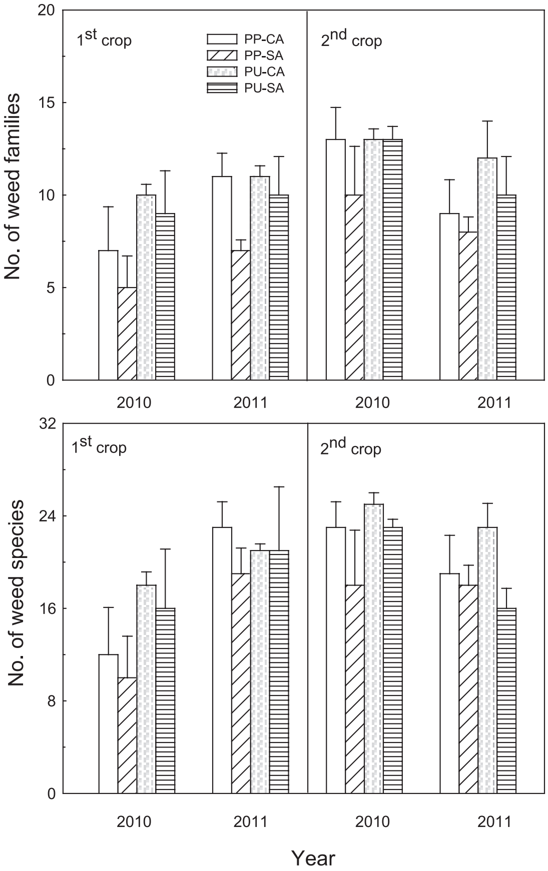


**圖 1.** 2010 年及 2011 年合計兩年四期作於各農耕生態系中雜草科別數與種別數之變化。

**Fig. 1.** Differences in numbers of weed families and weed species in vary cropping systems in the first and second cropping seasons of 2010 and 2011. PP: paddy-paddy agro-ecosystem; PU: paddy-upland rotation agro-ecosystem; CC: conventional cropping system; and LC: low-input cropping system.

一期作水田中除了千屈菜科與玄參科外，莎草科 (Cyperaceae)、禾本科 (Gramineae)、莧科 (Amaeanthaceae)、柳葉菜科 (Onagraceae) 等雜草，則錯落分布於田區。而在一期作的 PU 生態系中，2010 年 PU-CC 以菊科 (Compositae) 及玄參科等 2 科雜草，佔田區超過 50% 以上族群分布，PU-LC 以千屈菜科及莎草科爲多數。2011 年 PU-CC 及 PU-LC 田區數量達 50% 以上之雜草，分別以莎草科與千屈菜科、菊科與莎草科等 2 個科別最多 (圖 3)。

二期作 PP 生態系，無論是 2010 年或 2011 年，玄參科分布最多，田區高達 40–62% 爲此科雜草占據，平均發生密度達 56–177 plant m$^{-2}$，千屈菜科雜草則居次 (2010 年 PP-CC 除外)，田區約有 16–22% 分布 (圖 3)。二期作的水田環境已出現十字花科 (Crucuferae) 及菊科雜草，莎草科、禾本科、柳葉菜科及莧科則同時出現於一、二期作。在二期作 PU 生態系，2010 年 PU-CC 及 PU-LC 以菊科爲優勢雜草，2011 年因改變雜草管理方式，使分布略有不同，PU-CC 以菊科及莎草科最多，其次爲茄科 (Solanaceae)、十字花科、玄參科等，PU-LC 以茄科出現比例最高，其次爲旋花科 (Convolvulaceae)、菊科、禾本科、莎草科等 (圖 3)。

本研究整理出參試四種農耕生態系排名前 5 種雜草分佈次序 (表 6)，在水田連作的 PP 生態系，2010 年一期作之 CC 與 LC 處理區，皆以水莧菜 (*Ammannia baccifera*) 出現密度最高，其次爲芒稷、多花水莧 (*Ammannia multiflora*)、滿天星 (*Alternanthera sessilis*)、母草 (*Lindernia procumbens*)。2011 年一期作所出現的雜草種類未盡如 2010 年，但族群密度則較高；例如，出現最多的母草在 2010 年的分布僅有 1 plant m$^{-2}$，2011 年則大幅增加至 225 plant m$^{-2}$，另出現球花蒿草 (*Cyperus difformis*)、水莧菜、泥花草 (*Lindermia antipoda*)、木虱子 (*Fimbristylis littoralis*) 及碎米莎草 (*Cyperus iria*) 等雜草種類。二期作 PP 生態系出現之雜草種類與一期作部分相同，2010 年及 2011 年皆以母草最多，並有冬季裡作常出現之小葉碎米薺 (*Cardanmine flexuosa*)。

在水旱田輪作的 PU 生態系，2010 年一期作的 PU-CC 及 PU-LC 分別以霍香薊 (*Ageratum conyzoides*)、香附子 (*Cyperus rotundus*) 占多數，其它雜草種類有水莧菜、多花水莧、鱧腸 (*Eclipta prostrata*) 及母草等。2011 年則以水莧菜與鱧腸發生較多，依序另有水莧菜、香附子、球花蒿草、光果龍葵 (*Solanum americanum*) 及木虱子等。二期作種植旱作落花生，所發生之雜草多偏向旱田雜草種類，

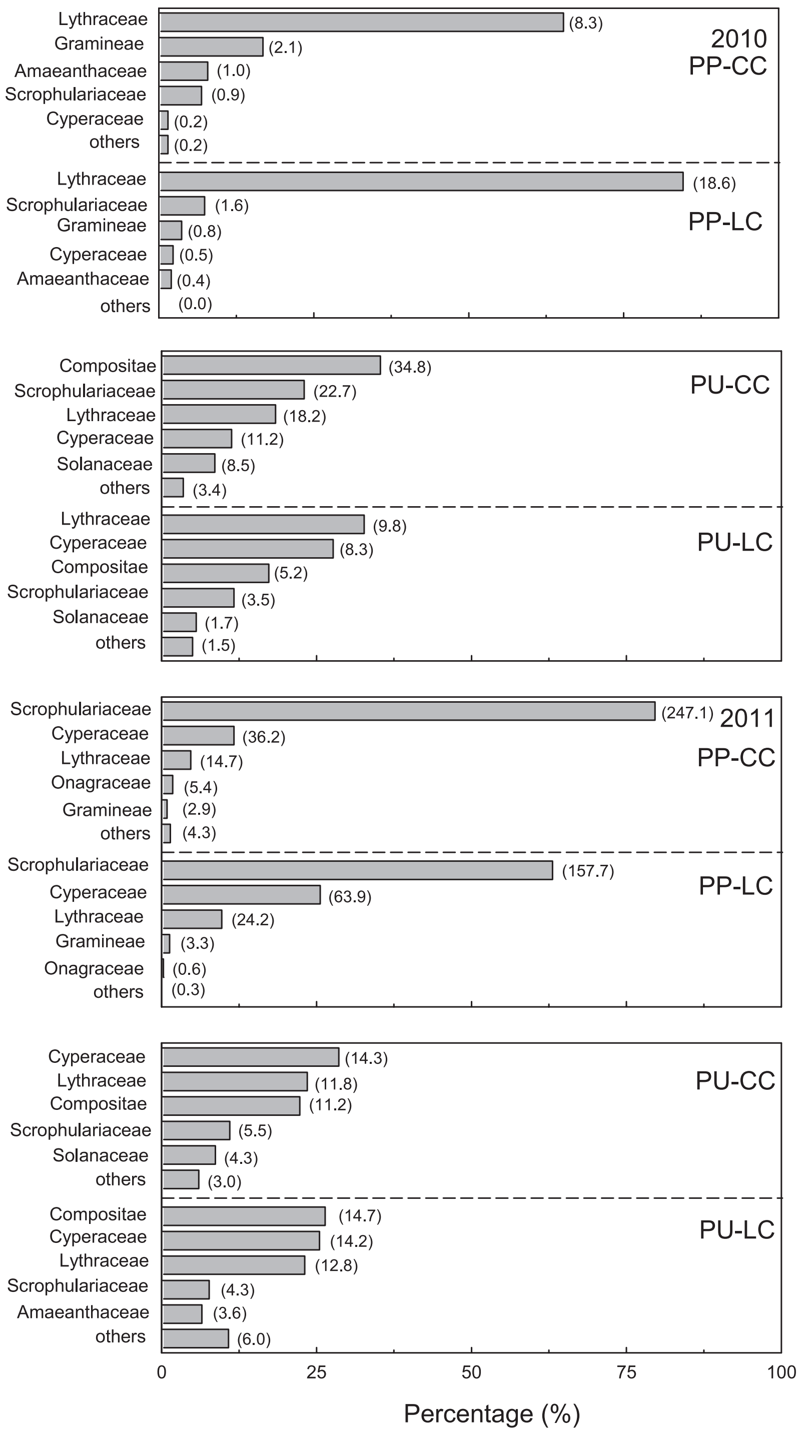


**圖 2.**　2010 年及 2011 年一期作各農耕生態系分布百分比最高之前 5 種雜草科別 (括弧內數值代表雜草密度)。

**Fig. 2.**　The population percentages and their densities (values in parentheses are means of plant $m^{-2}$) of the top five ranking weed families in vary cropping systems in the first cropping seasons of 2010 and 2011. PP: paddy-paddy agro-ecosystem; PU: paddy-upland rotation agro-ecosystem; CC: conventional cropping system; and LC: low-input cropping system.

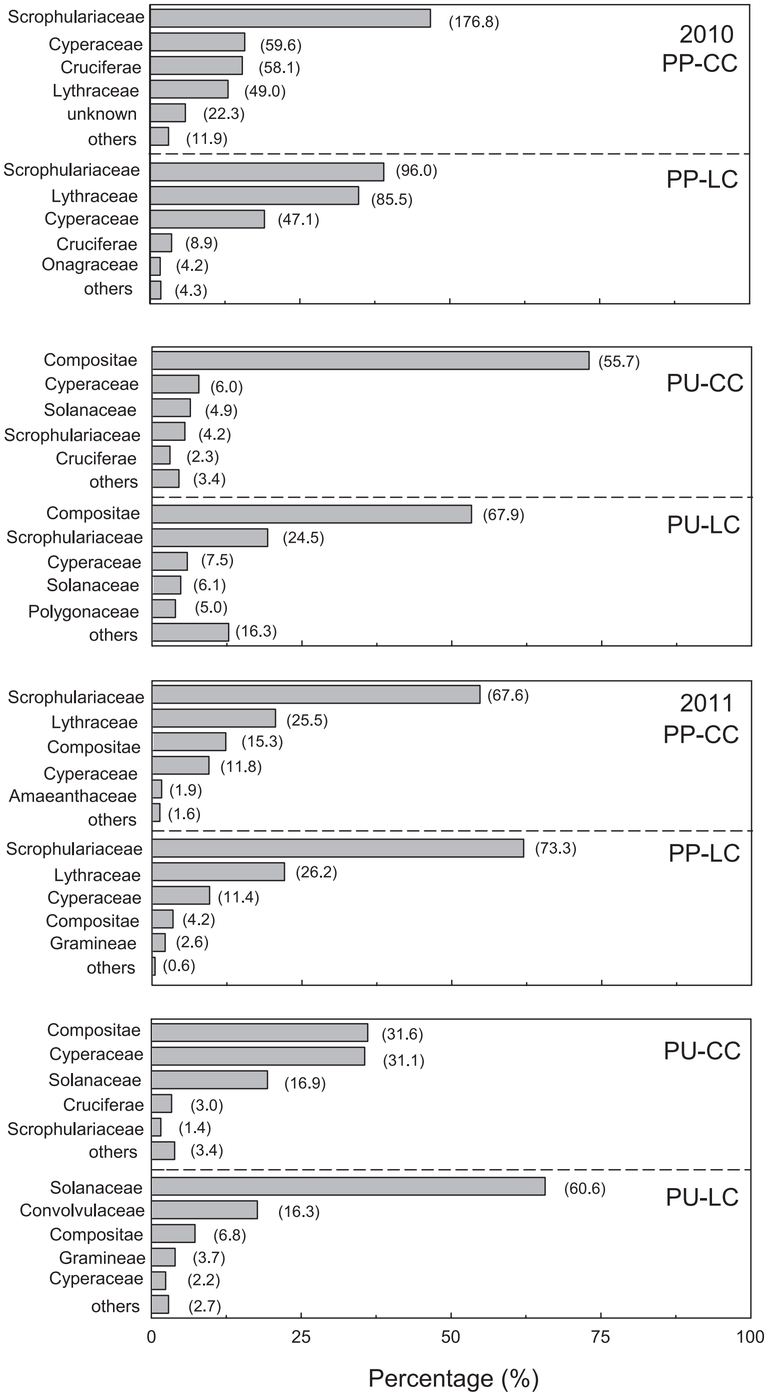


**圖 3.** 2010 年及 2011 年二期作各農耕生態系分布百分比最高之前 5 種雜草科別 (括弧內數值代表雜草密度)。

**Fig. 3.** The population percentages and their densities (values in parentheses are means of plant m$^{-2}$) of the top five ranking weed families in vary cropping systems in the second cropping seasons of 2010 and 2011. PP: paddy-paddy agro-ecosystem; PU: paddy-upland rotation agro-ecosystem; CC: conventional cropping system; and LC: low-input cropping system.

表 6. 2010 年及 2011 年一、二期作各農耕生態系發生密度最高之前 5 種雜草種類。

**Table 6.** The population densities of weed species for the top five rankings collected in various cropping systems in the first and second cropping seasons of 2010 and 2011.

| | | First crop | | | | Second crop | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CC[z] | | LC | | CC | | LC | |
| | | 2010 | 2011 | 2010 | 2011 | 2010 | 2011 | 2010 | 2011 |
| Crop season | Species | plant $m^{-2}$ (ranking) | | | | | | | |
| Paddy-paddy agro-ecosystem (PP) | *Alternanthera sessilis* | 1.0 ± 2.0 (4) | - | 0.4 ± 0.9 (4) | - | - | - | - | - |
| | *Ammannia baccifera* | 6.8 ± 12.8 (1) | 10.6 ± 8.5 (4) | 16.2 ± 12.5 (1) | 21.3 ± 20.1 (3) | 46.4 ± 24.6 (5) | 23.6 ± 6.7 (2) | 79.2 ± 89.5 (2) | 24.2 ± 3.05 (2) |
| | *Ammannia multiflora* | 1.5 ± 3.0 (3) | - | 0.6 ± 1.3 (3) | - | - | - | - | - |
| | *Aster subulatus* | -[x] | - | - | - | - | 14.1 ± 28.1 (4) | - | 2.8 ± 5.5 (4) |
| | *Cardamine flexuosa* | - | - | - | - | 56.7 ± 97.1(2) | - | 8.1 ± 10.6 (5) | - |
| | *Cyperus difformis* | - | 22.9 ± 16.9 (2) | - | 41.1 ± 58.1 (2) | - | - | - | 2.8 ± 2.1 (4) |
| | *Cyperus iria* | - | - | - | 5.5 ± 4.0 (5) | 54.3 ± 37.1 (3) | - | 38.3 ± 30.8 (3) | - |
| | *Echinochloa colona* | 1.6 ± 1.8 (2) | - | 0.4 ± 0.5 (5) | - | - | - | - | - |
| | *Fimbristylis littoralis* | - | 8.4 ± 8.3 (5) | - | 15.7 ± 10.4 (4) | - | 4.7 ± 8.9 (5) | 8.4 ± 11.8 (4) | 6.1 ± 5.7 (3) |
| | *Lindernia antipoda* | - | 22.0 ± 36.2 (3) | - | - | 51.2 ± 53.6 (4) | 18.2 ± 26.9 (3) | - | - |
| | *Lindernia procumbens* | 0.9 ± 1.8 (5) | 225.1 ± 194.9 (1) | 1.6 ± 3.3 (2) | 157.1 ± 110.5 (1) | 125.6 ± 106.6 (1) | 49.4 ± 77.3 (1) | 88.2 ± 87.7 (1) | 71.4 ± 68.3 (1) |
| | Others | 0.9 | 21.6 | 0.9 | 9.3 | 43.4 | 13.6 | 23.7 | 11.1 |
| | Total[y] | 12.6 | 310.6 | 20.2 | 250.0 | 377.6 | 123.6 | 245.9 | 118.3 |
| Paddy-upland rotation agro-ecosystem (PU) | *Ageratum conyzoides* | 17.8 ± 25.6 (1) | - | - | - | 34.0 ± 11.8(1) | 19.8 ± 6.3 (2) | 31.0 ± 19.1 (2) | 12.3 (3) |
| | *Alternanthera sessilis* | - | - | - | 3.2 ± 3.5 (4) | - | - | - | - |
| | *Ammannia baccifera* | 17.2 ± 22.4 (2) | 11.1 ± 6.6 (1) | 3.9 ± 3.0 (4) | 11.8 ± 18.4 (2) | - | - | - | - |
| | *Ammannia multiflora* | - | - | 5.8 ± 6.8 (2) | - | - | - | - | - |
| | *Cyperus difformis* | - | 4.3 ± 3.5 (5) | - | - | - | - | - | - |
| | *Cyperus rotundus* | - | 7.1 ± 6.8 (3) | 6.7 ± 6.3 (1) | 5.5 ± 5.5 (3) | 5.3 ± 5.8 (4) | 29.0 ± 22.7 (1) | 6.5 ± 0.4 (4) | - |
| | *Eclipta prostrata* | 17.0 ± 7.7 (3) | 9.8 ± 1.1 (2) | 5.1 ± 8.4 (3) | 14.0 ± 14.3 (1) | 22.8 ± 20.4 (2) | 11.0 ± 3.3 (4) | 36.4 ± 22.5 (1) | 2.7 ± 1.5 (5) |
| | *Eleusine indica* | - | - | - | - | - | - | - | 2.9 ± 5.1 (4) |
| | *Fimbristylis littoralis* | - | - | - | 3.2 ± 3.0 (4) | - | - | - | - |
| | *Ipomoea nil* | - | - | - | - | - | - | - | 16.3 ± 14.9 (2) |
| | *Lindernia antipoda* | 13.0 ± 11.6 (4) | - | - | - | 4.4 ± 2.9 (5) | - | 23.8 ± 13.1 (3) | - |
| | *Lindernia procumbens* | 9.5 ± 11.5 (5) | - | 2.3 ± 3.1(5) | - | - | - | - | - |
| | *Paspalum conjugatum* | - | - | - | 3.2 ± 5.5 (4) | - | - | - | - |
| | *Physalis angulata* | - | - | - | - | 5.9 ± 1.3 (3) | 16.7 ± 12.1 (3) | 6.1 ± 6.5 (5) | 60.5 ± 44.2 (1) |
| | *Rorippa indica* | - | - | - | - | - | 1.8 ± 3.2 (5) | - | - |
| | *Solanum americanum* | - | 4.3 ± 1.2 (4) | - | - | - | - | - | - |
| | Others | 24.3 | 13.5 | 6.1 | 14.8 | 9.7 | 9.2 | 28.1 | 5.7 |
| | Total | 98.8 | 50.1 | 29.8 | 55.5 | 87.0 | 87.4 | 131.9 | 100.3 |

[z] CC: conventional cropping system; LC: low-input cropping system.
[y] Total of weeds count.
[x] Not recorded.

2010 年 PU-CC 及 PU-LC 分別以霍香薊及鱧腸爲多數，皆屬於菊科雜草。2011 年試驗結果發現，PU-CC 以香附子分布較多，其次爲霍香薊、燈籠草 (*Physalis angulata*)、鱧腸、山芥菜，PU-LC 則以燈籠草出現最多，其次爲牽牛花 (*Ipomoea nil*)、霍香薊、牛筋草 (*Eleusine indica*)、鱧腸。二年調查試驗中，LC 處理區雜草密度有高於 CC 處理區之趨勢。

## 討論

爲瞭解雙期作水稻之 PP 生態系及水旱田輪作之 PU 生態系兩大作物生態系之雜草相變化，乃於 2010 及 2011 年 2 年 4 個期作進行雜草的取樣調查。本研究設計造成雜草差異的主因爲：(1) 水田連作 PP 與水旱田輪作 PU；(2) 高施肥量 CC 與低施肥量 LC；以及 (3) 2010 年與 2011 年間二期作 PU 生態系雜草管理之差異，以瞭解並比較施作處理間對雜草相之變化。

對發生之雜草科別及密度而言，一期作雜草平均發生密度 (PP 生態系加上 PU 生態系之平均值) 以 2011 年大於 2010 年，再從雜草生質量上觀察，亦有相同趨勢，顯示 2011 年不論在雜草數量及株形大小 (重量) 上皆大於 2010 年。可能 2011 年有適合雜草萌芽之環境，以至於使一期作之雜草數量及生質量高於 2010 年。而二期作種植水稻之 PP 生態系，2011 年少於 2010 年，對照雜草生質量之結果，發現 2011 年之生質量高於 2010 年，顯示在 2011 年二期作 PP 生態系每單位面積下的雜草密度較少，但平均鮮、乾重較大。由於二期作溫度相對較高 (Hsiao *et al.* 2011)，可能快速累積其生質量，使平均重量大於 2010 年。此外，水田連作的雜草密度高於水旱田輪作，而科別數則相當。施肥量雖有高低，惟在期作收穫前的雜草調查並未見明顯雜草密度差異，雖然氮肥對植物生長所產生之促進效果可能影響雜草種類的改變 (Di Tomaso 1995)，但本研究結果顯示，田區的環境狀況與作物種類的更迭似乎爲影響雜草相與密度變化的主要效應，兩者之間又存有交感效應 (Andersson & Milberg 1998; Swanton *et al.* 1999)。

由雜草密度統計各年度、各期作及各農耕生態系之雜草科別數與種別數，顯示 2011 年較 2010 年多了梧桐科與田麻科，惟此二科雜草分布密度小於 1 plant m$^{-2}$。由於溪口農場爲開放區域，是否由他處農田飄散而來，或由原本土壤種子庫萌發，需持續觀察其變化。無論係雜草科別數或種別數，概以一期作少於二期作，其原因可能由於二期作生育前期的環境溫度相對較高，而有較多的雜草科別數與種別數 (Hsiao *et al.* 2011)。其次，二期作之 PU 農耕生態系栽種旱作落花生，由於旱田與水田環境差異甚大，原先水田狀態休眠之旱作雜草將在旱田中陸續萌芽，可能因此使得 PU 之雜草種類多於 PP 者 (Chiang *et al.* 2003; Kuo 2004)。以發生科別而言，莧科 (Amaeanthaceae)、莎草科 (Cyperaceae)、禾本科 (Gramineae)、千屈菜科 (Lythraceae) 及玄參科 (Scrophulariaceae) 等雜草一、二期作均可見，且普遍發生於四種農耕生態系田區。此 4 科雜草在本試區 (溪口農場) 的分布較傳統水田優勢雜草禾本科爲強 (Chiang & Leu 1982)，其原因是否由環境、除草劑施用類型或其他因素，仍待進一步探討。

農田內與作物競爭環境資源主要來自於部分強勢雜草，這些雜草有較高密度的族群，其餘大多數雜草種類皆以低密度存在 (Chiang & Chiang 2010)。從發生密度最多之前 5 名雜草科別即可看出優勢雜草的分布與強度，同樣是在一期作，2010 年以千屈菜科雜草分布較多，玄參科排序落在第 2 或第 4，隔年在相同田區玄參科增加了近 97% 的族群數量，因此 2011 年似乎較適合此科雜草生長，尤其在 PP-CC 田區最多有 247 plant m$^{-2}$ 的分布。是否因氣候改變導致雜草相變動，將再觀察多年期試驗後深入分析瞭解。一期作 PU 生態系具有水田及旱田雜草相混合分布，雜草密度分布較爲平均，約需合計 2–3 科雜草數量才能達全數之 6 成以上，不若 PP 生態系常以單一雜草科別獨占田區。

在二期作 PP 生態系，分布最多的玄參科雜草，無論在水田或旱田皆能發現 (Lin 2009)，根據台灣植物誌 (Editorial Committee of the Flora of Taiwan 1996) 的記載，玄參科有 25 個屬，約有 70 幾種，不論在高山森林或平地沿海皆可見其蹤跡，可見此科雜草分布範圍廣泛。近年來加上水族業者引進各國觀賞水草，某些族群已趨近歸化的進入水田或濕潤地，隨著農業行爲散布，如最近新歸化之睫毛婆婆納 (*Veronica hederifolia*) 便有如強勢雜草般的入侵中高海拔的梨山農業區 (Shen *et al.* 2009)，因此關於此科入侵雜草的擴散應多加注意。

二期作 PU 生態系中，在無雜草管理差異的 2010 年中，落花生田區分布最多爲菊科雜草，由於旱田雜草防治上較水田雜草困難 (Chiang & Leu 1982; Chiang *et al.* 2003)，2010 年的落花生試驗田因雜草競爭等原因使收穫量下降。爲獲得合理產量，2011 年之旱作田區 CC 處理區較 LC 處理區多了人工除草的雜草管理，使 2 區的雜草相變動有了差異。在作季結束的雜草調查中，發現 PU-CC 的優勢雜草以菊科及莎草科爲多，其中菊科雜草較 2010 年發生數量及所佔比例已有下降，顯示經過除草劑及人工除草管理，似有控制菊科雜草的發生。但由於此科雜草生長力較盛，似乎能再次佔據田面，並與莎草科分布相當。在 PU-LC 中因少施行一次人工除草，使茄科競爭性似乎高過菊科或莎草科，以 61 plant $m^{-2}$ 的族群密度佔據 66% 雜草發生比例。雖然 CC 與 LC 田區皆進行相同除草劑管理，但由於旱田雜草生長快速，如未在適當時期進行防治將使植株過大，會使除草劑控制效果較低。PU-LC 田區因未施作人工除草，使雜草生質量皆較 PU-CC 大，茄科與旋花科快速覆蓋田面，降低菊科或莎草科的生長空間。

進一步分析發生最多的前 5 種雜草，PP 生態系爲連續水田耕作，田區發生型態多以水田雜草生長，一期作密度最高的水莧菜即是常見種類之一，另外母草則是逐漸增多的雜草種類，尤其在 2011 年發展的密度甚高，使得二期作 PP 生態系田區爲母草佔據。Chiang & Chiang (2006) 在 1981–2002 年進行的調查顯示，常年除草劑使用後以水莧菜 (*Ammannia baccifera*)、多花水莧 (*Ammannia multiflora*)、泥花草 (*Lindernia antipoda*)、碎米莎草 (*Cyperus iria*) 等雜草的發生頻率較高，與泥花草同屬的母草族群是否也因除草劑施用而增加，須持續觀察。此外，外來入侵的歸化植物掃帚菊 (*Aster subulatus*) 是濕地的強勢物種，似乎已蔓延至農地，是否影響其他弱草族群亦應注意。

PU 生態系在一期作雖然同樣進行水田耕作型態，但由於二期作種植旱作，加上草相調查爲作季收穫前，田區維持濕潤狀態，讓旱田雜草有機會萌芽出土，所以水田及旱田雜草交錯發生，常見的鱧腸即能在旱田中萌芽，亦能於水田中挺水生長 (Lin 2009)。二期作的旱作落花生生長初期與雜草的競爭力較弱，生質量累積速度不如雜草，必須在播種後 3–8 週內進行有效的雜草管理，減少雜草對後期生長及莢果生育的危害 (Chen & Chen 2005; Everman *et al.* 2008)，2010 年二期作以藿香薊及鱧腸占大多數，此 2 類雜草已在一、二期作皆可分布，是 PU 生態系中穩定存在的種類。值得注意的是，牽牛花是田區中潛在危害力逐漸增加的族群，雖然 2010 年的族群密度爲前 5 種雜草之外，但在 2011 年田區大面積攀附於落花生植株，影響其生長及增加採收困難度，因此在 PU-CC 區及時施行人工除草以降低牽牛花的競爭，而 PU-LC 區則無進行人工除草，試驗發現不同雜草管理措施將可改變農田雜草相組成 (Ryan *et al.* 2010)。除了牽牛花之外，燈籠草的密度亦相當高，由於植株生長快速，加上落花生多爲匍匐地面生長，可能遮蔽日光影響落花生光合作用而減產，因此在管理上需特別注意防除之最佳時機。對此本研究將視田區雜草分布狀況，動態調整雜草管理策略，目標著重於合宜進行雜草管理，減低與作物間的相互競爭力，維持低雜草密度下之適當生產，達到最佳管理模式。

綜合本研究 2 年 4 個期作試驗結果，透過長期的研究及調查能對照出不同作物生態系所提供之雜草族群種類，以及預測雜草族群的基本特性。本研究發現各農耕體系會對雜草相帶來改變，因此也將造成雜草管理上的差異。作者將持續收集更多年期資料來確認雜草相之變化與變遷，以提供不同農耕操作選擇之雜草管理應用，並由雜草相的變化動態調整管理模式，以提供符合生態保育的雜草管理方法，並且探討各農耕生態系的操作措施對雜草相改變的相關影響機制。

## 引用文獻


Andersson, T. N. and P. Milberg. 1998. Weed flora and the relative importance of site, crop, crop rotation, and nitrogen levels. Amer. Appl. Biol. 128:505–518.

Booth, B. D. and C. J. Swanton. 2002. Assembly theory applied to weed communities. Weed Sci. 50:2–13.

Chen, F. Y. and K. H. Chen. 2005. Evaluation of graminicides for weed control in peanut field. Weed Sci. Bull. 26:43–52. (in Chinese with English abstract)

Chiang, M. Y. and L. S. Leu. 1982. Weeds and weed damage of paddy field in Taiwan. Weed Sci. Bull. 3:18–46. (in Chinese with English abstract)

Chiang, M. Y., Y. J. Chiang, C. I. Yuan, L. M. Hsu, and F. Y. Chen. 2003. Current status and prospects of weed management of croplands in Taiwan. p.245–258. *in*: Proceedings of 2003 International Conference on Plant Health Management. October 28–29, 2003. Yunlin, Taiwan. All In Agriculture Development Foundation, Taipei. (in Chinese with English abstract)

Chiang, Y. J. and M. J. Chiang. 2006. Handbook on Herbicides and Farmland Weed in Taiwan. Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute Press, Taichung. 259 pp.

Chiang, M. Y. and Y. J. Chiang. 2010. Potential impacts of climate change on agricultural land and environmental weeds in Taiwan. p.99–116. *in*: Proceedings of the International Workshop on Climate Change and Food Crisis. July 9, 2010. Tainan, Taiwan. Tainan District Agricultural Research and Extension Station, COA, Tainan. (in Chinese with English abstract)

Cheng, S. H. 1997. The effect of rotation on soil of chemical and physical and weeds in the paddy field. Bull. Hualien DARES 14:79–94. (in Chinese)

Di Tomaso, J. M. 1995. Approaches for improving crop competitiveness through the manipulation of fertilization strategies. Weed Sci. 43:491–497.

Editorial Committee of the Flora of Taiwan. 1996. Flora of Taiwan. 2nd ed. Department of Botany, National Taiwan University. Taipei. 861pp.

Everman, W. J., S. B. Clewis, W. E. Thomas, I. C. Burke, and J. W. Wilcut. 2008. Critical period of weed interference in peanut. Weed Technol. 22:63–67.

Francis, C. A., M. D. Clegg, and S. C. Mason. 1989. Alternatives to Monoculture: Alternatives to Monocultural Sustainable Systems for U. S. Crop Production. Issue 301 of Extension Bulletin. ASPAC Food & Fertilizer Technology Center. Taipei. 19 pp.

Ho, N. K. and K. Itoh. 1991. Change in weed flora and their distribution in the Muda area. Paper presented at the 8th MADA/TRAC Quarterly Meeting on November 3, 1991. Alor Setar, Malaysia.

Hsiao, C. L., C. M. Yang, and Y. J. Lee. 2011. Effect of planting date on population and weeds in the paddy field. J. Taiwan Agric. Res. 60:139–148. (in Chinese with English abstract)

Kent, R., D. E. Johnson, and M. Becker. 2001. The influences of cropping system on weed communities of rice in Cote d'Ivoire, West Africa. Agric. Ecosystem Environ. 87:299–307.

Kuo, W. H. 2004. Seed ecology and weed management. Weed Sci. Bull. 25:53–68. (in Chinese with English abstract)

Lègére, A., F. C. Stevenson, and N. Ziadi. 2008. Contrasting response of weed communities and crops to 12 year of tillage and fertilization treatments. Weed Technol. 22:309–317.

Lin, C. C. 2009. A Field Guide to Aquatic & Wetland Plants of Taiwan. Commonwealth Publishing Co. Taipei. 319 pp.

Liebman, M. and E. Dyck. 1993. Crop rotation and intercropping strategies for weed management. Ecol. Appl. 3:92–122.

Moody, K. 1996. Weed community dynamics in rice fields. p.27–36. *in*: Herbicides in Asian Rice: Transitions in Weed Management. (Naylor, R., ed.) Institute for International Studies and International Rice Research Institute. Palo Alto and Manila. 270 pp.

Ryan, M. R., R. G. Smith, S. B. Mirsky, D. A. Mortensen, and R. Seidel. 2010. Management filters and species traits: Weed community assembly in long-term organic and conventional systems. Weed Sci. 58:265–277.

Shen, M. Y., C. I. Peng, and T. W. Hsu. 2009. *Veronica hederifolia* L. (Scrophulariaceae) newly naturalized to Taiwan. Endem. Species Res. 11:47–50.

Smith, R. G. and K. L. Gross. 2006. Raid change in the germinable fraction of the weed seed bank in crop rotations. Weed Sci. 54:1094–1100.

Swanton, C. J., A. Shrestha, R. C. Roy, and S. Z. Knezevic. 1999. Effect of tillage systems, N, and cover crop on the composition of weed flora. Weed Sci. 47:454–461.

Tungate, K. D., D. W. Israel, D. M. Watson, and T. W. Rufty. 2007. Potential changes in weed competitiveness in an agro-ecological system with elevated temperatures. Environ. Exp. Bot. 60:42–49.

VanGessel, M. J. 2001. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. Weed Sci. 49:703–705.

# Different Agro-Ecosystems Affect Population and Density of Weeds in Paddy-Paddy and Paddy-Upland Rotation Systems

Chiao-Ling Hsiao[1], Chewn-Ming Yang[2,*], and Chia-Hsun Ho[1]

## Abstract

Hsiao, C. L., C. M. Yang, and C. H. Ho. 2013. Different agro-ecosystems affect population and density of weeds in paddy-paddy and paddy-upland rotation systems. J. Taiwan Agric. Res. 62(2):106–125.

Changes in population and density of weeds occur in different cropping systems with time. To delineate variation and progress of weeds under paddy-paddy agro-ecosystem (PP) and paddy-upland rotation agro-ecosystem (PU) of a two-crop system, studies were conducted at long-term agricultural ecological research (LTER) station located in Sikou Experimental Farm of Taiwan Agricultural Research Institute. Within each agro-ecosystem, there were two types of practice, conventional cropping system (CC) and low-input cropping system (LC), making up four agro-ecosystems in total, namely, PP-CC, PP-LC, PU-CC and PU-LC. This paper summarized the results from investigations and analyses of data acquired in 2010 and 2011. As the results shown, weed density was higher in LC than in CC and in 2011 than in 2010 in first crops, suggesting that cropping treatments were not yet stabilized so that LC treatment was not have less weeds as expected. Because of such a situation, weed biomass of CC was higher than LC in 2010, but not in 2011. In second crops, PP had a larger weed population and density than that of PU, particularly in 2010, indicating richer weeds in paddy fields than in uplands. Among these four agro-ecosystems, generally larger numbers of weed family and species were found in second crops, yet vary yearly, reflecting a complicated factors intervention in weed infestations. The most populated weed family of PP was Lythraceae in 2010 and was Scrophulariaceae in 2011 for first crop, and was Scrophulariaceae for second crop in both years. Of the PU, family of Compositae and Lythraceae were the most populated weeds for PU-CC and PU-LC, respectively, in first crop of 2010, and it was family of Cyperaceae and Compositae, respectively, in 2011. Weeds of family Compositae were predominant in both agro-ecosystems in second crop of 2010 and weeds of family Compositae and Solanaceae were the predominated ones in 2011 for PU-CC and PU-LC, respectively. As for weed species, plants of *Ammannia baccifera* occupied the most in PP in first crop of 2010, while *Lindernia procumbens* took the lead in 2011 as well as in second crop of both years. In PU, population of *Agcratum conyzoides* was the highest, followed by *Cyperus rotundus* in first crop of 2010. The top two populations in 2011 were *Ammannia baccifera* and *Eclipta prostrate*. In second crop, *Agcratum conyzoides* and *Eclipta prostrata* were listed in the first two rankings in 2010, but were *Cyperus rotundus* and *Physalis angulata* in 2011. Apparently, changes in weed family and species will be affected by multifactors such as ecology, cropping system and climate and hence, will fluctuate in seasons and years. It requires more investigations to clarify how long weed populations will reach a dynamic balance among each other.

**Key words:** Long-term agricultural ecosystem, Paddy-paddy agro-ecosystem, Paddy-upland rotation agro-ecosystem, Conventional cropping system, Low-input cropping seasons.

---

Received: January 3, 2013; Accepted: March 22, 2013.
[*] Corresponding author, e-mail: cmyang@trai.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Fellow, Director-General Office/Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(2):126–136 (2013)
10.6156/JTAR/2013.06202.03

# 杏鮑菇廢棄基質在菇類栽培之應用

陳美杏[1] 李瑋崧[1] 吳寬澤[2] 簡宣裕[3] 呂昀陞[1,*]

## 摘要

陳美杏、李瑋崧、吳寬澤、簡宣裕、呂昀陞。2013。杏鮑菇廢棄基質在菇類栽培之應用。台灣農業研究 62(2):126–136。

台灣大部分菇類以木屑為主要栽培原料，為求森林保育與菇類產業永續發展，開發木屑替代資材實為菇類產業之重要課題。由於採收僅一週期的菇類廢棄基質含有豐富之營養，若能再次回收並應用於菇類栽培，不僅可以有效降低生產成本，還可減少對新鮮木屑之需求。本研究以不同乾重比例之杏鮑菇廢棄基質取代新鮮木屑，用以栽培秀珍菇、鴻喜菇和巴西蘑菇等菇類，結果顯示不同處理之間對於秀珍菇走菌和出菇所需之天數並無顯著性差異，但在產量上，以廢棄基質取代 1/3 新木屑之處理 209.6 g $bag^{-1}$，顯著高於以新木屑栽培秀珍菇之處理 188.5 g $bag^{-1}$，而以廢棄基質取代 1/2 及 2/3 新木屑處理之產量和全新木屑栽培之對照組則無顯著性差異。在鴻喜菇試驗方面，添加杏鮑菇廢棄基質處理之產量 1,211.9–1,261.8 g/12 瓶，均顯著高於未添加廢棄基質之對照組 947.8 g/12 瓶。巴西蘑菇則以添加杏鮑菇廢棄基質 1/2 處理之產量 133.7 g $bag^{-1}$ 為最高，顯著高於未添加處理者 122.1 g $bag^{-1}$，覆土到出菇採收的天數也隨著添加的廢棄基質比例增加而增加，但採收間期則隨著添加的廢棄基質比例增加而縮短，因此對整體栽培週期並無影響。本研究顯示杏鮑菇栽培後基質可應用於秀珍菇、鴻喜菇和巴西蘑菇之栽培，而取代木屑的比例則依菇種不同可分別取代 1/3 到 1/2。

**關鍵詞**：廢棄基質、杏鮑菇、秀珍菇、鴻喜菇、巴西蘑菇。

## 前言

菇類營養豐富，味道鮮美，且含有許多生理活性成分，如多醣體、三萜類、麥角固醇、核苷酸、蛋白多醣、膳食纖維等，具有免疫調節、降血壓、降血糖、降膽固醇、抗腫瘤、抗細菌病毒及延緩骨質疏鬆等保健功效 (Lindequist *et al.* 2005)，加上近年來養生與保健風氣盛行，菇類廣受重視，新興菇類如雨後春筍般地相繼推出，許多野生的菇種也陸續被開發應用，因此非常具有發展潛力。隨著菇類產業的蓬勃發展，相對所產生的廢棄基質數量也隨之增加，目前國內每年生產之太空包數目約爲 29,600 萬包，菇類栽培瓶約 7,500 萬瓶 (Wang 2009)，若以每包/瓶之基質重量爲 1 kg 計算，估計生物效率爲 40% (Wei *et al.* 2010)，換算每年所產生之廢棄資材超過 20 萬公噸。這些數量龐大的廢棄物，如果未經妥善處理則會衍生許多環境問題，不僅容易孳生蚊蠅，還可能成爲木黴菌或其他雜菌之溫床，進而影響到菇類栽培環境之衛生。

爲解決菇類栽培廢棄基質對環境造成之影響，並使菇類產業永續發展，各國皆已投入龐大研發能量針對菇類栽培後介質的再利用進行開發，再利用之方式包括製成有機肥料、育苗介質或抑病介質 (Chiu & Huang 1997; Huang & Huang 2000; Wang & Huang 2000)、作爲禽畜或魚類飼料 (Permana *et al.* 2000;

投稿日期：2013 年 1 月 10 日；接受日期：2013 年 3 月 21 日。
* 通訊作者：yunsheng@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所農業化學組研究員。台灣 台中市。

Bao *et al.* 2009)、脫水後做為燃料或是生質能源 (Hideno *et al.* 2007)、作為生態環境之修復材料 (Chiu *et al.* 2009)、從中萃取酵素如木質素分解酵素漆酶 (laccase) (Trejo-Hernandez *et al.* 2001) 或多醣體等，以及作為其他菇類栽培之原料等等 (Sharma & Jandaik 1985; Royse 1992; Akamatsu 1998; Liang *et al.* 2005; Jo *et al.* 2008; Li *et al.* 2008; Wan *et al.* 2009)。

台灣現行菇類栽培仍以木屑為主要原料，然而伴隨著環保意識抬頭與人造林木供應不足且緩慢，使得木屑來源逐漸短缺而致使價格上漲，現在每 kg 新鮮木屑售價已較過去上漲 5 成以上，菇農正面臨著原料匱乏和生產成本增加之雙重壓力，為減少砍伐森林又不致使菇類生產原料供應出現缺口，積極開發木屑替代資材實是刻不容緩的研究課題 (Li *et al.* 2012)。檢視各種菇類，可發現不同菇類對於栽培基質之利用程度不同，因而導致不同菇類栽培後廢棄基質所含之營養成分有明顯差異 (Yang *et al.* 2008)，其中僅採收一週期之菇類，如杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*) 與金針菇 (*Flammulina velutipes*) ，由於栽培時間短，因此廢棄基質中所含之養分仍相當豐富，以杏鮑菇為例，採收一週期之乾物質損失率僅有 16.4–24.6%，顯示廢棄基質中仍有 75% 以上之乾物質尚未被完全利用 (Chen *et al.* 2005)。這些栽培後廢棄基質若僅作為有機堆肥或禽畜飼料，其衍生之利用價值太低，如能將其作為木屑替代物供太空包製作之用，不僅可有效利用這些廢棄基質，還能減少新木屑之需求。台灣農業試驗所菇類研究室曾利用所內試驗栽培杏鮑菇採收後之基質再次栽培杏鮑菇 (塑膠瓶栽方式)，結果發現添加廢棄基質栽培者之產量均高於以新鮮木屑栽培者，且利用栽培後廢棄基質替代木屑可降低材料成本約 40% (Chen *et al.* 2005)；利用菇類栽培後廢棄基質再次栽培菇類，不僅可減少農業廢棄物，還能增加其經濟效益，而且由於所添加之菇類栽培後基質已經過菇類菌絲分泌酵素初步之分解，產生許多較易被菇類菌絲吸收和利用之小分子之化合物，因此能促使菇類菌絲生長更為快速 (Di Lena *et al.* 1997)。

為了日後能將廢棄基質推廣應用於實際菇類生產，因此本研究以民間大規模商業化栽培杏鮑菇所產生之廢棄基質進行試驗，探討其取代新鮮木屑種植秀珍菇 (*P. sajor-caju*)、鴻喜菇 (*Hypsizygus marmoreus*) 和巴西蘑菇 (*Agaricus braziliensis*) 之可行性，並做為推薦農民或太空包業者製作太空包時之參考。

## 材料與方法

### 菇類品系

本研究採用秀珍菇 (菌株代號 SJ-10)、鴻喜菇 (菌株代號 HM-011) 和巴西蘑菇 (菌株代號 AB-04) 3 個菇種，菌株皆來自農業試驗所菇類研究室，並分別以馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA; Difco, Maryland, USA) 斜面培養基做定期更新培養。

### 麥粒菌種之製作

麥粒先以清水洗淨，加水煮至熟透，濾掉多餘水份後，加入重量比約 1% 之碳酸鈣拌勻，然後分裝至菌種瓶中，封好瓶口，以高溫高壓 (121℃，1.2 kg $cm^{-2}$) 滅菌釜滅菌 1 h。隔夜冷卻後，將上述培養在 PDA 培養基上的菇類菌絲塊，連同 PDA 培養基一起移入麥粒瓶中，置於 24℃ 中培養至菌絲長滿為止。

### 新鮮木屑、杏鮑菇栽培後之廢棄基質、米糠和粉頭之化學成分比較

新鮮山黃麻 [*Trema orientalis* (Linn.) Blume] 木屑、杏鮑菇栽培廢棄基質 (購自台中市新社區青松農場)、米糠 (rice bran) 和粉頭 (wheat bran) 分別逢機取樣送農業試驗所農業化學組分析化學成分，樣品以濃硫酸及催化劑分解後，以擴散法測定全氮含量；另以硝酸與過氯酸分解樣品之後，以感應耦合電漿儀 (ICP，法國 Jobin-Yvon 公司) 測定全磷、鉀及微量元素之含量。

### 新鮮木屑及杏鮑菇廢棄基質之熱水抽出物對菇類菌絲生長之影響

為了解杏鮑菇栽培後廢棄基質中是否含

有對菇類生長具抑制性之物質，因此測試杏鮑菇栽培後廢棄基質之熱水抽出物，對於不同菇類菌絲生長之影響，分別秤取 250 g 之山黃麻木屑和杏鮑菇栽培廢棄基質 (購自台中市新社區青松農場) 加入 1 L 的蒸餾水中煮至沸騰經 30 min，然後以 4 層紗布過濾，再加入麥芽抽出物 20 g、葡萄糖 20 g、蛋白腖 1 g 和洋菜 20 g，並以蒸餾水調整容量為 1 L，經過高溫高壓滅菌後倒入直徑 9 cm 的培養皿中，凝固後分別接種經 PDA 培養基培養 6 d 之上述菇類菌絲塊 (直徑 5 mm)，並以蒸餾水作為對照，置於 24℃ 定溫箱中培養 7 d 後，記錄菌落的大小。

## 杏鮑菇廢棄基質對於菇類菌絲生長之影響

配方一為杏鮑菇栽培後廢棄基質，將其加入 1% 碳酸鈣調整 pH 值為 6.5，並將含水量調整為 65%；配方二則以新鮮山黃麻木屑和杏鮑菇栽培後廢棄基質以乾重比 2：1 混合，並加入總乾重 20% 之米糠和 1% 碳酸鈣，含水量同上；配方三則為新鮮木屑添加乾重 20% 米糠，含水量亦同。秤取 20 g 各處理之基質放入 9 cm 之玻璃培養皿中，將表面以稱藥匙整平之後滅菌，然後在培養皿中間接種上述菇類之菌絲塊 (直徑 5 mm)，置於 24℃ 定溫箱中培養 10 d 後，記錄菌落的大小。

## 杏鮑菇廢棄基質添加比例對於秀珍菇產量之影響

新鮮山黃麻木屑加水堆積 3 個月，期間每個月翻堆一次，杏鮑菇栽培後廢棄基質則由台中市新社區青松農場提供，先分別測定兩種基質的含水量，再分別以乾重比 (山黃麻木屑：杏鮑菇廢棄基質) 1：0、1：1、1：2 及 2：1 等比例混合，每一處理均添加總乾重 25% 之粉頭、20% 之米糠及 1% 之碳酸鈣，製作成每包約 1,000 g 重之太空包 (濕重)；經高溫高壓滅菌後，接種秀珍菇之麥粒菌種 SJ-10，然後移入培養室定溫培養，菌絲生長期間不照光。當秀珍菇的菌絲長滿太空包基質後，即可去除太空包頸部棉塞並移入出菇室，出菇條件設定為日溫 26℃、夜溫 18–20℃，並利用超音波加濕機維持 95% 相對溼度，控制二氧化碳濃度低於 1,000 ppm，密集產生菇體後日夜溫度均設定 26℃，維持 85–90% 間相對溼度，且減少換氣使二氧化碳濃度達 1,500 ppm 以利菇柄抽長，待菇傘直徑發育至約 5 cm 時採收，調查各處理之產量及出菇所需天數。各試驗排列採逢機區集設計，每一處理 10 重複，每一重複 9 包。

## 杏鮑菇栽培廢棄基質添加比例對鴻喜菇產量之影響

將杏鮑菇廢棄基質和新鮮木屑以乾重比 1：0、1：1、1：2 及 2：1 等比例混合，每一處理均添加總乾重 15% 之米糠、10% 粉頭和 10% 玉米粉及 2% 之碳酸鈣，所有混合物之含水量均調整至 65% 左右，經自動化裝瓶機 (廣太原，台中市霧峰區，台灣) 裝填至聚丙烯 (PP) 材質之塑膠瓶中 (1,100 mL)，經過高溫高壓滅菌後，分別接種鴻喜菇品系 HM-011 之菌種，然後移入培養室中定溫培養，培養期間不照光。當鴻喜菇的菌絲長滿塑膠瓶內之基質後，需再經過 1 個月的培養等待養份轉化完成，然後將表面老化的菌種部分去除，移入出菇室，溫度設定為 16℃，利用超音波加濕機設定溼度為 90–95%，二氧化碳濃度為 1,500 ppm 以下，以刺激原基體形成，小菇體密集產生後控制濕度於 85–90% 間，待菇體發育至菌傘尚未反捲前採收，調查各處理之產量及出菇所需天數。各試驗排列採逢機區集設計，每一處理 8 重複，每一重複 12 瓶。

## 杏鮑菇廢棄基質添加比例對於巴西蘑菇產量之影響

將栽培過杏鮑菇之廢棄基質和新鮮木屑分別以 0：1、1：1 和 1：2 之比例混合，每一處理均添加總乾重 15% 之米糠和 1% 碳酸鈣，含水量調整為 63%，以太空包製作機裝填成每包 1 kg 重之基質 (濕重)，經過高溫高壓滅菌後，接種巴西蘑菇之麥粒菌種 AB-

04，移入培養室定溫培養，菌絲長滿後移入出菇室移除塑膠袋進行裸包覆土栽培，白天和晚上設定日夜溫差 10℃，二氧化碳濃度為 1,500 ppm，相對溼度設定為 90%，待菇體發育成熟後採收，比較三種處理之出菇特性及產量。

### 統計分析

以 SAS 統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 後，以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD test) 探討每一試驗各處理間平均值之差異性。

## 結果

### 新鮮木屑、杏鮑菇栽培後之廢棄物、米糠和粉頭之成分比較

分析新鮮木屑、杏鮑菇栽培後之廢棄基質、米糠和粉頭之成分，結果發現新鮮木屑之含氮量最低，只有 0.3%，米糠和粉頭之含氮量分別為 2.6% 和 3.6%，而杏鮑菇栽培後廢棄基質之含氮量高達 1.3% (表 1)，此外，只栽培一週期之杏鮑菇廢棄基質除了含氮較高外，磷含量是新鮮木屑的 7 倍，鉀則為新鮮木屑之 2 倍。此外尚含豐富之微量元素，例如鎂、鐵、錳等離子的含量均高於新鮮木屑。

### 木屑及杏鮑菇廢棄基質熱水抽出物對菇類菌絲生長之影響

以新鮮木屑抽出物和蒸餾水之培養基作為對照組，結果顯示秀珍菇和鴻喜菇在含有廢棄基質之熱水抽出物之培養基菌絲生長速度最慢 (表 2)，巴西蘑菇生長則以在含有廢棄基質之熱水抽出物之培養基菌絲生長最快，但和含有新鮮木屑熱水抽出物之處理無 5% 顯著性差異。

### 杏鮑菇廢棄基質對於菌絲生長之影響

比較杏鮑菇廢棄基質、杏鮑菇廢棄基質和新木屑 1：2 混合及新木屑三種處理對於菇類菌絲生長之影響，結果發現秀珍菇和鴻喜菇的菌絲生長在三種不同處理間無 5% 顯著性差

**表 1.** 新鮮木屑、杏鮑菇栽培後之廢棄基質、米糠和粉頭之成分比較。

**Table 1.** Comparison of chemical ingredients in fresh sawdust, spent king oyster mushroom substrate, rice bran and wheat bran.

| Chemical ingredient | Fresh sawdust | Spent king oyster mushroom substrate | Wheat bran | Rice bran |
|---|---|---|---|---|
| Water content (%) | 55.5 ± 0.8[y] | 49.9 ± 0.5 | 9.7 ± 0.0 | 11.3 ± 0.1 |
| N (%) | 0.3 ± 0.0 | 1.3 ± 0.0 | 3.6 ± 0.0 | 2.6 ± 0.0 |
| P (ppm) | 360.0 ± 3.0 | 2,663.0 ± 71.0 | 28,063.0 ± 325.0 | 10,268.0 ± 73.0 |
| K (ppm) | 3,260.0 ± 0.0 | 6,767.0 ± 64.0 | 26,969.0 ± 0.0 | 12,899.0 ± 0.0 |
| Ca (ppm) | 4,207.0 ± 60.0 | 3,756.0 ± 54.0 | 769.0 ± 29.0 | 605.0 ± 10.0 |
| Mg (ppm) | 821.0 ± 24.0 | 2,215.0 ± 12.0 | 12,485.0 ± 73.0 | 5,265.0 ± 39.0 |
| Fe (ppm) | 1,170.0 ± 89.0 | 1,614.0 ± 47.0 | 208.0 ± 5.0 | 237.0 ± 3.0 |
| Mn (ppm) | 59.7 ± 0.9 | 76.4 ± 2.2 | 224.3 ± 1.4 | 139.6 ± 1.3 |
| Cu (ppm) | 2.5 ± 0.4 | 6.6 ± 0.3 | 13.1 ± 0.9 | 12.8 ± 1.1 |
| Zn (ppm) | 22.4 ± 4.2 | 37.5 ± 2.1 | 132.1 ± 4.6 | 91.1 ± 1.6 |
| Organic matter (%) | 95.7 ± 0.0 | 94.2 ± 0.2 | 86.4 ± 0.1 | 94.0 ± 0.0 |
| Organic carbon (%) | 55.6 ± 0.0 | 54.8 ± 0.1 | 50.2 ± 0.0 | 54.7 ± 0.0 |
| C/N[z] | 185.9 | 41.0 | 13.9 | 20.9 |

[z] C/N = organic carbon (%)/nitrogen (%).
[y] Values are mean ± standard error.

異；巴西蘑菇在含有杏鮑菇廢棄基質之處理皆遠優於新鮮木屑處理者，且達 5% 顯著性差異，其中又以兩者混合處理的效果最好，但與杏鮑菇廢棄基質處理間無 5% 顯著性差異 (表 3)。

### 杏鮑菇廢棄基質添加比例對於秀珍菇產量之影響

以杏鮑菇栽培廢棄基質與新鮮木屑以 0：1、1：2、1：1 和 2：1 等比例栽培秀珍菇，經過一個月的菌絲培養，所有處理間在菌絲生長速度上並無明顯差異。採收 4 週期之總產量，以添加 1/3 杏鮑菇栽培後基質之處理者，產量顯著高於新鮮木屑對照組，平均每包之產量爲 209.6 g (表 4)，而添加 1/2 或 2/3 之杏鮑菇栽培後廢料 (192.6 g bag$^{-1}$ 與 203.3 g bag$^{-1}$) 與新鮮木屑對照組培養 (188.5 g bag$^{-1}$) 等處理間產量並無 5% 顯著性差異。然若比較

**表 2.** 杏鮑菇栽培後基質與木屑之熱水抽出物對於秀珍菇、鴻喜菇與巴西蘑菇菌絲生長之影響。

**Table 2.** Effect of hot water extracts from spent king oyster mushroom substrates and fresh sawdust on mycelial growth of *Pleurotus sajor-caju*, *Hypsizygus marmoreus*, and *Agaricus braziliensis* after 7 days inoculation at 24℃.

| Extraction source$^z$ | Colony diameter (cm) | | |
|---|---|---|---|
| | *P. sajor-caju* | *H. marmoreus* | *A. braziliensis* |
| Fresh sawdust | 7.6 ± 0.2 ab$^y$ | 4.4 ± 0.1 a | 2.9 ± 0.3 ab |
| Spent substrate | 7.1 ± 0.4 b | 4.1 ± 0.1 b | 3.1 ± 0.2 a |
| Distilled water | 8.0 ± 0.4 a | 4.4 ± 0.2 a | 2.7 ± 0.2 b |

$^z$ All treatments consisted of 1 L extraction solution, 20 g malt extract, 20 g glucose, 1 g peptone and 20 g agar.
$^y$ Values are mean ± standard error. Means with the same letter of a column are not significantly different at 5% level by LSD test.

**表 3.** 杏鮑菇栽培後基質與山黃麻木屑之混合物對於秀珍菇、鴻喜菇與巴西蘑菇菌絲生長之影響。

**Table 3.** Effect of spent king oyster mushroom substrate and fresh sawdust on myclial growth of *Pleurotus sajor-caju*, *Hypsizygus marmoreus*, and *Agaricus braziliensis* after 10 days inoculation at 24℃.

| Substrate$^z$ | Colony diameter (cm) | | |
|---|---|---|---|
| | *P. sajor-caju* | *H. marmoreus* | *A. braziliensis* |
| Spent substrate | 5.7 ± 0.4 a$^y$ | 5.1 ± 0.2 a | 3.4 ± 0.3 a |
| New sawdust:Spent substrate = 2:1 | 5.9 ± 0.3 a | 5.1 ± 0.2 a | 3.9 ± 1.0 a |
| New sawdust | 6.0 ± 0.9 a | 5.1 ± 0.1 a | 0.9 ± 0.8 b |

$^z$ Spent substrate = Spent king oyster mushroom substrate; New sawdust = Sawdust of *Trema orientalis*.
$^y$ Values are mean ± standard error. Means with the same letter of a column are not significantly different at 5% level by LSD test.

**表 4.** 杏鮑菇廢棄基質與木屑不同混合比例對秀珍菇 SJ-10 之產量比較。

**Table 4.** Comparison of yield of Pleurotus sajor-caju strain SJ-10 grown in media containing different ratio of fresh sawdust and spent king oyster mushroom substrate.$^z$

| Ratio of fresh sawdust and spent substrate | Water content (%) | pH | Yield of each flush (g bag$^{-1}$)$^y$ | | | | Total yield (g bag$^{-1}$) | Biological efficiency (%)$^x$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1st | 2nd | 3rd | 4th | | |
| 2:1 | 62.81 | 5.38 | 89.7 | 47.1 | 51.1 | 21.7 | 209.6 ± 18.5 a$^w$ | 58.1 ± 5.4 a |
| 1:1 | 62.60 | 5.45 | 76.6 | 44.4 | 53.3 | 18.3 | 192.6 ± 12.6 b | 53.0 ± 3.3 b |
| 1:2 | 63.51 | 5.45 | 81.8 | 53.1 | 55.5 | 12.9 | 203.3 ± 18.9 ab | 57.6 ± 4.9 a |
| 1:0 | 61.35 | 5.72 | 59.6 | 49.5 | 66.9 | 12.5 | 188.5 ± 15.6 b | 49.7 ± 4.1 b |

$^z$ All treatments consisted of 25% of wheat bran and 20% of rice bran on dry weight basis. Water content of the substrate was adjusted to 63%. The substrate was filled into polypropylene bags using a semi-automatic filling machine and sterilized at 121℃ for 1 h.
$^y$ Ten replicates for each treatment and nine bags for each replicate.
$^x$ Biological efficiency (%) = the weight of fresh mushroom harvested/dry matter content of substrate before inoculation × 100.
$^w$ Values are mean ± standard error. Means with the same letter of a column are not significantly different at 5% level by LSD test.

其生物效率，則以廢棄基質取代 1/3 和 2/3 木屑處理者較高，顯著高於廢棄基質取代 1/2 木屑和新鮮木屑處理者。

### 杏鮑菇廢棄基質添加比例對於鴻喜菇產量之影響

在菌絲生長速度方面，鴻喜菇 HM-011 品系培養在不同處理配方之間走菌完成時間並無明顯差異，惟在木屑培養基上，菌絲在添加杏鮑菇栽培後基質處理者較木屑對照組生長較濃密。在產量上以在廢棄基質取代 1/2 新鮮木屑處理者最高，平均每框 (12 瓶塑膠瓶) 之產量爲 1,261.8 g，生物效率爲 38.1% (表 5)，其次爲廢棄基質取代 1/3 木屑處理者，以廢棄基質不同取代比例之間無顯著性差異，但均高於新鮮木屑栽培者，且達 5% 顯著性差異。從入庫至出菇採收時間鴻喜菇 HM-011 品系在添加不同廢棄基質比例者爲 23–24 天，比以新鮮木屑種植者 28 天早約 4–5 天。

### 不同杏鮑菇廢棄基質添加比例對於巴西蘑菇產量之影響

將栽培過杏鮑菇之廢棄基質添加不同比例之堆積過的新木屑及米糠調配成巴西蘑菇栽培基質，在太空包菌絲生長初期，未添加杏鮑菇廢棄基質之對照組菌絲生長較快，到後期則以添加 1/2 杏鮑菇廢棄基質之處理菌絲生長最快，三種試驗處理之菌絲約需 2 個月才能走滿太空包，因此各處理間對巴西蘑菇菌絲生長並無影響。菌絲長滿後進行裸包覆土栽培，對照組及廢棄基質取代 1/3 木屑和 1/2 木屑處理者，從覆土至開始採菇天數分別爲 28 d、42 d 與 48 d，添加比例越高者開始出菇的天數越晚；惟採收期則剛好相反，添加比例越高者，採收時間越短，分別爲 88 d、71 d 與 64 d，而計算自覆土到完全採收之時間分別爲 116 d、113 d 與 112 d，顯示各處理間不會對採收天數造成影響；統計每包之平均產量，以廢棄基質添加 1/2 的產量最高，爲 133.7 g $bag^{-1}$ (表 6)，明顯高於對照未添加處理者 122.1 g $bag^{-1}$，以廢棄基質取代 1/3 新木屑處理者產量最低爲 112.9 g $bag^{-1}$。

## 討論

菇類栽培所需材料之購買成本與日俱增，因此許多菇類在考量其售價與栽培成本，如僅進行一次性栽培，無形中會導致材料之浪費，依前人研究顯示菇類栽培後廢棄基質由於具有下列特性，可再次作爲菇類栽培的材料：(1) 菇類在菌絲生長過程中已部份分解木質素、纖維素和半纖維素，使得廢棄基質內難以分解的大分子化合物減少，因此更容易使後續栽培的菇類能利用這些碳源生長，根據

**表 5.** 比較杏鮑菇廢棄基質與木屑不同混合比例對於鴻喜菇 HM-011 從瓶口去皮至出菇採收所需天數與產量之影響。

**Table 5.** Effect of different ratio of fresh sawdust and spent king oyster mushroom substrate as growth substrate on the days from bottle scraping to 1st harvest and yield of bunashimeji strain HM011.[z]

| Ratio of fresh sawdust and spent substrate | Days from bottle scraping to 1st harvest | Yield (g/12 bottles)[y] | Biological efficiency (%)[x] |
|---|---|---|---|
| 1:0 | 28.0 ± 0.0 a[w] | 947.8 ± 95.8 b | 28.4 ± 2.9 b |
| 2:1 | 23.6 ± 0.5 b | 1,211.9 ± 152.5 a | 32.7 ± 4.1 a |
| 1:1 | 23.3 ± 0.5 b | 1,261.8 ± 68.0 a | 38.1 ± 2.1 a |
| 1:2 | 23.9 ± 1.7 b | 1,247.0 ± 97.5 a | 36.9 ± 2.9 a |

[z] All treatments consisted of 10% of wheat bran, 10% of corn flour and 15% of rice bran on dry basis. Water content of the substrate was adjusted to 65%. The substrate was filled into polypropylene bottles using an automatic filling machine and sterilized at 121℃ for 1 h.

[y] Eight replicates for each treatment.

[x] Biological efficiency (%) = weight of fresh mushroom harvested/dry matter content of substrate before inoculation × 100.

[w] Values are mean ± standard error. Means with the same letter of a column are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 6. 杏鮑菇廢棄基質與木屑不同混合比例對巴西蘑菇 AB-04 之產量比較。

**Table 6.** Comparison of yield of *Agaricus braziliensis* strain AB-04 grown in media containing different ratio of fresh sawdust and spent king oyster mushroom substrate.[z]

| Ratio of fresh sawdust and spent substrate | Days from casing soil to 1st harvest | Harvest period (days) | Yield ($g\ bag^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| 1:0 | 28.0 ± 0.8 c[y] | 88.0 ± 2.2 a | 122.1 ± 3.0 b |
| 2:1 | 42.0 ± 1.4 b | 71.0 ± 1.4 b | 112.9 ± 3.5 c |
| 1:1 | 48.0 ± 0.8 a | 64.0 ± 0.8 c | 133.7 ± 5.3 a |

[z] All treatments consisted of 15% of rice bran on dry weight basis. Water content of the substrate was adjusted to 63%. The substrate was filled into polypropylene bags using a semi-automatic filling machine and sterilized at 121℃ for 1 h.
[y] Values are mean ± standard error. Means with the same letter of a column are not significantly different at 5% level by LSD test.

Royse (1992) 的研究顯示利用新鮮橡樹木屑種植秀珍菇的生物效率最低，只有 9.6%，如果利用香菇栽培後的基質再種植秀珍菇，則可以使生物效率提高至 66.4%，作者推論可能和新舊木屑中所含的可利用性的纖維成份有關；(2) 菇類在生長過程中產生的多醣體、蛋白質等化合物，可以作爲菇類營養生長時所需的養分。謝佑生等人 (Xie *et al.* 1986) 分析種完鳳尾菇之廢棄基質，其中蛋白質含量比未栽培之基質增加 39%、還原醣增加 87.14%、總多醣增加 27.36%，這些增加的物質皆可成爲菇類生長的養分來源；(3) 添加菇類栽培後廢棄基質可加速菇類營養生長階段木質素纖維素複合體的分解，並提高木質纖維素的降解和利用率 (Feng *et al.* 1996)，作者推論可能的原因爲添加廢棄基質使得栽培基質中氮的含量較高，提供較爲合適的碳氮比滿足菌絲對於氮的需求，因而促進菌絲生長，加速對於木質纖維素的利用。

本試驗分析僅栽培一周期之杏鮑菇廢棄基質含有有機質 94.2%，含氮量 1.3%，先前的報導 (Hou *et al.* 2008) 則指出食用菌的菌糠 (即廢棄基質，以下稱「廢棄基質」) 中氮含量 1.27%，與本試驗分析結果相近。Rinker *et al.* (2004) 分析種過蠔菇 (*Pleurotus ostreatus*) 之介質中含氮量爲 1.7%，磷和鉀則分別爲 0.61% 和 1.13%，顯示不同基質經菇類栽培後，其所含之部分養份可被轉化供菇體發育之用，但仍有部分的養分和菌絲則還留在廢棄基質中。

不同菇類對於養份有不同的需求，有些菇類的產量和添加養分的量呈正比，有些菇類則是含氮量太高反而產量下降，同一種菇類不同菌株對於氮源的需求也不盡相同，彭金騰等人 (Peng *et al.* 2000) 曾比較不同比例的米糠對杏鮑菇不同品系的產量，結果發現杏鮑菇品系 ATCC36047 的產量和米糠的添加量呈正比，但品系 Holland 150 的生物效率則以添加基質總乾重 38% 之米糠爲最高，添加至 48% 的米糠反而生物效率下降。倪新江等人 (Ni *et al.* 1995) 發現在香菇栽培過程中 C/N 不斷下降，適量增加氮源可以提高香菇產量。惟 Silva *et al.* (2005) 報導香菇種植時，所用營養中如果含有高濃度的氮會抑制木質素分解 (ligninolytic activity)。筆者等曾經試驗一批杏鮑菇栽培後基質作爲鴻喜菇栽培添加之用，由於該批杏鮑菇栽培的產量不佳，因此基質中含氮量仍高達 2.4%，如果取代新鮮木屑超過 2/3，反而抑制菌絲的生長，進而影響產量 (資料未顯示)。本次試驗所使用之基質經過分析，結果新鮮木屑處理者含氮量爲 0.6–0.9%，而添加杏鮑菇栽培後廢棄基質之處理者的含氮量爲 0.99–1.50% (資料未顯示)，秀珍菇以添加 1/3 廢棄基質的產量最高，而鴻喜菇和巴西蘑菇均以添加 50% 廢棄基質之處理較好，顯示不同菇類對於杏鮑菇廢棄基質的適應性不同，且廢棄基質對同一菇種不同菌株產量影響有待進一步研究。

菇類在生長過程中會產生一些二次代謝物，如有機酸等物質，會累積於栽培基質中，因而使得基質的 pH 值下降，例如香菇栽培介質在出菇前酸鹼值只有 pH 4 (Ohga 1999)，本試驗所使用的杏鮑菇栽培基質栽培前酸鹼值

為 pH 6.5–6.8，採收完之廢棄基質則降至 pH 5.3–5.8，顯示栽培後介質中含部分有機酸類物質。而在菇類栽培的配方中還有添加其他的輔料，如米糠、粉頭等，也會讓基質的酸鹼值下降，而添加菇類廢棄基質又比新鮮木屑之酸鹼值低，因此會建議比一般正常的配方多加約 1–2% 之碳酸鈣，才不致因為栽培基質酸鹼值太低而影響到菇類的菌絲生長。Royse (1992) 的研究亦發現利用香菇栽培後廢棄基質種植秀珍菇的生物效率和所添加的碳酸鈣濃度成正相關。

菇類菌絲生長過程中除了產生有機酸之外，還會產生一些對其他微生物具有抑制的抗生物質，即使經過高溫處理後仍不會分解，不同菇類廢棄基質對於不同菇類之菌絲生長影響不同，而同一種菇類的不同菌株間也會有所差異。李俐俐和劉天學 (Li & Liu 2007) 以蠔菇 (*P. ostreatus*) 廢棄基質萃取液測試對 5 種菇類菌絲生長之影響，結果發現對於茶樹菇、金針菇和黑木耳之菌絲生長有促進作用，對於杏鮑菇和白靈菇之菌絲則為抑制，此一結果和趙桂云和馬懷良 (Zhao & Ma 2010) 的試驗結果相異，後者發現蠔菇 (*P. ostreatus*) 廢棄基質抽出物可促進黑木耳和杏鮑菇菌絲生長，但抑制蠔菇、雞腿菇菌絲生長，比較兩者不同之處有二：(1) 兩者所使用的廢棄基質雖都來自栽培蠔菇，但兩者的配方不同，前者主要材料為玉米芯和棉仔殼，後者則為豆秸和木屑；(2) 兩者所使用的培養基配方不同，前者使用廢棄基質提取液和 PDA 做不同比例之混合，後者則是以減量的 PDA 配方加入不同比例之廢棄基質，兩個方法以後者的比較基礎較為接近。張國慶等人 (Zhang *et al.* 2009) 以杏鮑菇廢棄基質提取液測試靈芝、鴻喜菇、秀珍菇和蠔菇菌絲之影響，結果和對照 PDA 比較，對 4 種菇類菌絲生長均有抑制。日本學者 Akamatsu (1998) 則以冷水萃取方式作為廢棄基質是否適合作為其他菇類栽培評估的標準。筆者比較冷水和熱水萃取的結果，熱水萃取物顏色較深，但兩者的試驗結果趨勢相同 (資料未顯示)。另外以熱水萃取和直接以廢棄基質培養測試其對於菇類菌絲生長之影響，兩者的結果稍有不同，如巴西蘑菇培養在新鮮木屑和廢棄基質抽出物處理兩者間無顯著性差異，但直接以廢棄基質培養較以新鮮木屑生長為佳，這應該是在進行熱水抽出物的試驗時，培養基中還添加了其他養分，因而淡化了不同處理之間的差異，建議評估廢棄基質對於不同菇類之適應性時，應直接以栽培後基質作為試驗材料較準確。

一般菇類的廢棄基質之含水量在 50–60% 之間，又富含養分，並不適宜於常溫下保存，若不能馬上使用，可以加水堆積 3–6 個月，也可以在平常生產太空包的殺菌過程中，利用鍋爐產生的多餘蒸氣將其烘乾，使含水量降至 10% 以下，以避免雜菌孳生 (Li 2003)。此外，不同批次的廢棄基質在成分上會有些微的差異，因此使用時應觀察其基本性狀如含水量及酸鹼值等略做調整。

由於各種菇類對於基質之分解能力有所差異，因此可以制定一套菇種栽培順序，優先栽培對於木質素分解能力較強的菇種，如側耳科 (Pleurotaceae) 的菇類 (Song & Deng 2004)，故可先種植如蠔菇或秀珍菇，使其分解利用木屑中的木質素，隨後再依據各菇種對木質素分解能力之差異，依序利用廢棄基質進行栽培。如此可讓同一批木屑生產不同菇種，減少新木屑需求量，同時兼顧保育森林的目的。綜合本試驗之結果，杏鮑菇廢棄基質可以應用於秀珍菇、鴻喜菇和巴西蘑菇之栽培，取代木屑的比例 1/3 到 1/2，由於不同菇類對於廢棄基質的適應性不同，在應用之前對於所使用的菇種最好先進行初步試驗。

## 引用文獻

Akamatsu, Y. 1998. Reutilization of culture wastes of *Pleurotus ostreatus* and *Pholiota nameko* for cultivation of *Lyophyllum decastes*. J. Wood Sci. 44:417–420.

Bao, H. N. D., Y. Shinomiya, H. Ikeda, and T. Ohshima. 2009. Preventing discoloration and lipid oxidation in dark muscle of yellowtail by feeding an extract prepared from mushroom (*Flammulina velutipes*) cultured medium. Aquaculture 295:243–249.

Chen, J. T., S. Y. Chien, J. T. Peng, and M. H Chen. 2005. Recycling application of spent king oyster mushroom substrate for production of *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quél. J. Taiwan Agric. Res. 54:235–244. (in Chinese with English abstract)

Chiu, A. L. and J. W. Huang. 1997. Effects of composted agricultural and industrial wastes on the growth of vegetable seedlings and suppression of their root diseases. Plant Pathol. Bull. 6:67–72. (in Chinese with English abstract)

Chiu, S. W., T. Gao, C. S. S. Chan, and C. K. M. Ho. 2009. Removal of spilled petroleum in industrial soils by spent compost of mushroom *Pleurotus pulmonarius*. Chemosphere 75:837–842.

Di Lena, G., V. Vivanti, and G. B. Quaglia. 1997. Amino acid composition of wheat milling by product after bioconversion by edible fungi mycelia. Nahrung 41:285–288.

Feng, Z., Z. Wang, Y. Pan, and M. Chen. 1996. Effect of spent artificial log and supplement on biodegradation of lignocellulose in the substrate of *Lentinula edodes*. Acta Edulis Fungi 3:9–16.

Hideno, A., H. Aoygai, S. Isobe, and H. Tanaka. 2007. Utilization of spent sawdust matrix after cultivation of *Grifola frondosa* as substrate for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. Food Sci. Technol. Res. 13:111–117.

Hou, L. J., F. J. Yao, R. Gao, and Y. J. Chen. 2008. Research of reutilization of edible fungi on fungal chaff. Edible Fungi China 27:6–8. (in Chinese with English abstract)

Huang, J. W. and H. C. Huang. 2000. A formulated container medium suppressive to Rhizoctonia damping-off of cabbage. Bot. Bull. Acad. Sin. 41:49–56.

Jo, W. S., J. S. Kim, D. H. Cho, S. D. Park, and H. E. Jung. 2008. Fruitbody development of *Pleurotus ostreatus* via bottle cultivation using recycled substrate. Mycobiology 36:157–160.

Li, X. M. 2003. Development and utilization of edible fungi residue. J. Henan Agric. Sci. 5:40–42. (in Chinese)

Li, L. L. and T. X. Liu. 2007. Effect of aquatic extraction substance from residue of *Pleurotus ostreatus* on hyphal growth of five edible fungi. J. Anhui Agric. Sci. 35:430–432. (in Chinese with English abstract)

Li, Q., X. P. Hu, S. F. Lu, Y. X. Chen, and J. L. Bao. 2008. Research on shiitake cultivation by utilization the spent culture medium of *Pleurotus eryngii*. Edible Fungi 6:28–29. (in Chinese)

Li, W. S., Y. S. Lue, and M. H. Chen. 2012. Rice straw for production of Phoenix-tail mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. J. Taiwan Agric. Res. 61:90–99.

Liang, Z. C., C. Y. Wu, and J. C. Wang. 2005. The evaluation of using mushroom sawdust wastes for cultivation of *Pleurotus citrinopileatus*. Fungal Sci. 20:27–34.

Lindequist, U., T. H. J. Niedermeyer, and W. D. J. Jűlich. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. Evid. Based Complement Alternat. Med. 2:285–299.

Ni, X., Y. Pan, Z. Feng, and R. Li. 1995. Effect of supplement kinds and contents in sawdust medium on the growth and development of *Lentinula edodes*. Acta Edulis Fungi 2:6–10.

Ohga, S. 1999. Evaluation of maturity by use of pH indicators in sawdust-based cultures of *Lentinula edodes*. J. Wood Sci. 45:431–434.

Peng, J. T., C. M. Lee, and Y. F. Tsai. 2000. Effect of rice bran on the production of different king oyster mushroom strains during bottle cultivation. J. Agric. Res. China 49:60–67.

Permana, I. G., G. Flachowsky, U. Meulen, and F. Zadrazil. 2000. Use of sugarcane bagasse for mushroom and animal feed production. Mushroom Sci. 15:385–390.

Rinker, D. L., Zero Emissions Research and Initiatives, and S. W. Kang. 2004. Recycling of spent mushroom substrate. p.187–191. *in*: Mushroom Growers' Handbook 1: Oyster Mushroom Cultivation. MushWorld-Heineart, Seoul. 287 pp.

Royse, D. J. 1992. Recycling of spent shiitake substrate for production of the oyster mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. Appl. Microbiol. Biot. 38:179–182.

Sharma, V. P. and C. L. Jandaik. 1985. Studies on recycling of *Pleurotus* waste. Mushroom J. Tropics 6:13–15.

Silva, E. M., A. Machuca, and A. M. F. Milagres. 2005. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry wastes. Lett. Appl. Microbiol. 40:283–288.

Song, R. Q. and X. Deng. 2004. Study on biodegradated ability of thirteen edible fungi to straw. J. Forestry Res. 15:223–226.

Trejo-Hernandez, M. R., A. Lopez-Munguia, and R. Q. Ramirez. 2001. Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds. Process Biochem. 36:635–639.

Wan, S. X., H. B. Zhu, F. Li, G. Y. Jiang, and X. S. Guo.

2009. Research on *Agaricus bisporus* cultivation by utilization the spent culture medium of *Pleurotus geesteranus*. Edible Fungi China 28:20–22. (in Chinese with English abstract)

Wang, B. C. 2009. Edible and medicinal value of mushrooms and their development of diversity products. Agric. Biotech. Ind. Quart.18:34–40. (in Chinese)

Wang, P. C. and J. W. Huang. 2000. Characteristics for inhibition of cucumber damping-off by spent forest mushroom compost. Plant Pathol. Bull. 9:137–144. (in Chinese with English abstract)

Wei, Z. T., G. Y. Zhou, and Q. X. Hu. 2010. Research and utilization of edible fungi residue. Edible Fungi China 29:3–6. (in Chinese with English abstract)

Xie, T. S., Z. X. Wu, and X. Zhang. 1986. The nutritional value of spent substrates from phoenix tail mushroom. Edible Fungi 8:41. (in Chinese)

Yang, Y., J. Luo, E. Y. Qiw, X. Miao, G. Y. Li, and C. W. Hu. 2008. Chemical composition analysis and pyrolysis of two mushroom residues. Chem. Res. Appl. 20:1457–1460.

Zhang, G. G., L. X. Wang, L. Y. Zhan, Y. Zhang, and J. M. Zou. 2009. Effect of spent substrate of *Pleurotus eryngii* on the mycelia growth of four edible fungi. Edible Fungi China 28:19–20. (in Chinese with English abstract)

Zhao, G. Y. and H. L. Ma. 2010. Effect of water extracts of spent oyster mushroom substrates on mycelial growth of four kinds of mushrooms. Northern Hort. 22:170–171. (in Chinese)

# Recycling of Spent King Oyster Mushroom Substrate for Production of Mushrooms

Mei-Hsing Chen[1], Wei-Sung Li[1], Kaun-Tzer Wu[2], Shiuan-Yuh Chien[3], and Yun-Sheng Lue[1,*]

## Abstract

Chen, M. H., W. S. Li, K. T. Wu, S. Y. Chien, and Y. S. Lue. 2013. Recycling of spent king oyster mushroom substrate for production of mushrooms. J. Taiwan Agric. Res. 62(2):126–136.

Sawdust is a main ingredient for cultivation of edible mushrooms. In Taiwan, the annual demand of sawdust for mushroom production has increased to more than 350 thousand tons in recent years. Using sawdust for mushroom production is not only expensive but also environmentally unsound. In Taiwan, an estimated 200 thousand tons of spent mushroom substrates were produced annually and most of them were used as organic compost for growing crops. However, most of the spent mushroom substrates are nutrient rich and they are of potential for reuse in growing mushrooms. The objective of this study was to determine the feasibility of production of phoenix tail mushroom (*Pleurotus sajor-caju*), Bunashimeji (*Hypsizygus marmoreus*), and sunny mushroom (*Agaricus braziliensis*), using spent king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) substrates collected after harvesting as an ingredient in the growth substrate. The ratio of fresh sawdust (*Trema orientalis*) and spent king oyster mushroom substrate in the growth substrate was 2:1, 1:1, 1:2, or 1:0 (w/w, dry weight) for the production of phoenix tail mushroom and Bunashimeji; and 1:0, 2:1 or 1:1 (w/w, dry weight) for the production of sunny mushroom. Results showed that yield of phoenix tail mushroom in the growth substrate containing fresh sawdust and spent king oyster mushroom substrate at 1:1 or 1:2 ratio was not significantly different from the treatment of 1:0 (fresh sawdust alone). Yield of Bunashimeji in the treatment of fresh sawdust and spent king oyster mushroom substrate at 1:1, 2:1, or 1:2 ratio (w/w, dry weight) was higher than the treatment of 1:0. For sunny mushroom, yield was the highest in the treatment of fresh sawdust and spent king oyster mushroom substrate at 1:1 ratio (w/w, dry weight). These results suggest that the spent king oyster mushroom substrate can be used to replace fresh sawdust for production of phoenix tail mushroom, Bunashimeji and sunny mushroom and the optimum rate of spent king oyster mushroom substrate for mushroom production varies with mushroom species. In addition, the use of spent king oyster mushroom substrate will reduce the demand of fresh sawdust and, thereby, reduce the mushroom production cost and improve environmental health.

**Key words:** Spent substrate, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus sajor-caju*, *Hypsizygus marmoreus*, *Agaricus braziliensis*.

---

Received: January 10, 2013; Accepted: March 21, 2013.
[*] Corresponding author, e-mail: yunsheng@trai.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellow, Plant Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(2):137–156 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06202.04

# 分子標幟輔助耐鹽水稻之選育

郭素真[1]　郭介煒[2]　林彥蓉[3]　吳永培[4,*]

## 摘要

郭素真、郭介煒、林彥蓉、吳永培。分子標幟輔助耐鹽水稻之選育。台灣農業研究 62(2):137–156。

本研究以稉型稻耐鹽品系 SM61 為貢獻親，而世界栽培面積廣泛的優良秈稻品種 IR64 為輪迴親，透過回交方式將 SM61 之耐鹽性轉移至 IR64，過程中利用 200 mM 氯化鈉 (NaCl) 溶液的鹽分逆境處理挑選出耐鹽的植株，並於各回交世代 $F_1$ 進行分子標幟輔助背景選拔，結果發現各 $BC_1F_1$、$BC_2F_1$ 及 $BC_3F_1$ 世代回復輪迴親比率分別為 75.0、89.0、96.4%，高於傳統回交方式之 $BC_3F_1$ 世代回復至輪迴親之 93.8% 的結果，顯示利用分子標幟輔助可較快速回復輪迴親 IR64 之遺傳背景，提高耐鹽水稻新品種之選育效率。而以 SM61、IR64 及 6 個 $BC_3F_4$ 品系於三葉齡、五葉齡、七葉齡及最高分蘗期等 4 個時期，分別以 200 mM NaCl 的鹽分逆境處理評估材料之耐鹽性表現，試驗發現 ST12、ST18 及 ST59 等 3 個品系之耐鹽性表現優於貢獻親 SM61 及輪迴親 IR64，顯示已將 SM61 之耐鹽特性導入 IR64 中，培育出高耐鹽之秈型稻新品系。而進一步評估 20 個耐鹽品系 ($BC_3F_4$) 產量表現，結果發現各品系產量均可達 5,000 kg $ha^{-1}$ 以上，顯示獲選之耐鹽品系皆已具有實際栽培價值，未來於命名成為新品種後，其將可供鹽分地水稻之栽培利用，進而增加未來國內外稻米糧食之生產。

**關鍵詞**：分子標幟輔助選拔、突變品系、耐鹽水稻。

## 前言

水稻 (*Oryza sativa* L.) 係世界排名前三名之重要糧食作物，隨著全球人口數量持續增加，預計在 2030 年時將達到 80 億，水稻生產則必須增加 50% 方可滿足人類對糧食的需求 (Khush & Brar 2002; Khush 2005)。然而，人口的增長可能使得一些耕作土地轉變爲工業及居住用地，迫使水稻之耕作轉移至生產力較低的鹽分地，使得糧食短缺現象雪上加霜。此一窘境，促使研究學者積極投入水稻耐鹽性之相關研究。

在邁入後基因體時代後，水稻育種學家試著將分子生物技術融入於傳統育種工作上，藉以縮短水稻新品種育成的年限。國際水稻基因體計畫 (International Rice Genome Sequencing Project; IRGSP) 於 1997 年開始針對稉稻 ‘日本晴’ (‘Nipponbare’) 進行水稻基因體序列的研究，並於 2005 年完成全基因體共約 389 Mb 的解序 (International Rice Genome Sequencing Project 2005)。此一結果促進了各種分子標幟的發展，隨後更將其應用於水稻育種上，藉以提高育種效率和準確性 (Collard & Mackill 2008)，此即現行所稱的分子標幟輔助選拔 (marker-assisted selection; MAS)。此一作法除了能夠縮短傳統育種所需的年限外，還具備目標植株挑選不受到環境干擾的效果，目標基因性狀更可於植株幼苗期進行選拔，獲得減少田間種植數量、人力和物力花費等的優點。尤有甚者，其能夠於單一植株上同

投稿日期：2013 年 1 月 30 日；接受日期：2013 年 4 月 12 日。
* 通訊作者：wuypei@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義試驗分所農藝系研究助理。台灣 嘉義市。
[2] 國立嘉義大學農藝學系助理教授。台灣 嘉義市。
[3] 國立台灣大學農藝學系副教授。台灣 台北市。
[4] 農委會農業試驗所嘉義試驗分所農藝系副研究員。台灣 嘉義市。

時進行多個性狀的選拔，或將多個優良性狀基因堆砌於同一優良水稻品系中。

目前水稻育種上利用分子標幟輔助育種技術的成果相當多，如：國際稻米研究所 (International Rice Research Institute; IRRI) 將稉稻 Azucena 上所發現的 4 個與耐旱相關的數量性狀基因座 (quantitative trait locus; QTL)，利用分子標幟輔助回交育種方法將 QTLs 片段轉移至優良栽培種 ‘IR64’，有效提高 ‘IR64’ 的耐旱性 (Courtois & Lafitte 2003)。又利用分子標幟輔助回交育種方法，將耐淹浸 *Sub1* QTL，導入 ‘Swarna’、‘IR64’ 和 ‘Sumba Mahsuri’ 等水稻品種，除了保有品種原有的高產和優良農藝性狀外，更增加了耐淹之特性，培育出超越原親本之優良品種 (‘mega’ varieties; Neeraja *et al.* 2007)。此外，其他尙有抗稻熱病 (Hittalmani *et al.* 2000)、抗褐飛蝨 (Sharma *et al.* 2004; Myint *et al.* 2012)、產量、半矮性 (Ashikari *et al.* 2005) 及大量應用 MAS 在改良水稻育種上的多個實例 (Collard *et al.* 2008) 等，有效提高了水稻的米質、抗病及抗逆境的特性。至於在耐鹽水稻品種育成上，目前印度已經藉由地方栽培種，成功培育出 ‘Damodar’、‘Pokkali’、‘Nona Bokra’ 和 ‘Bhura Ratha’ 等耐鹽的水稻品種，但是大部分的品種產量均表現不佳 (Singh & Mishra 2004)，這些稻種皆仍利用傳統育種方式選育，藉由分子標幟輔助選育的模式則尙處於測試階段。國際稻米研究所曾利用 ‘Pokkali’ 和 ‘IR29’ 雜交之 $F_8$ 重組自交系族群所進行的耐鹽研究中，發現一個高耐鹽品系 ‘FL478’ (‘IR66946-3R-178-1-1’)，目前已利用分子標幟輔助回交育種方式，將 FL478 *saltol* QTLs 轉入一些優良品種中，以期培育出高耐鹽且高產的新品系 (Thomson *et al.* 2010)；其次，亦根據圖譜定位找到 3 個與幼苗存活日數相關之 QTLs，其幼苗存活日數會因耐鹽 QTLs 的堆疊數目增加而提高植株的耐鹽性 (Cheng *et al.* 2012)。

物理和化學誘變可加速作物變異，係品種改良上值得嘗試的途徑，而目前利用誘變開發耐鹽水稻之研究成果並不多，Jwo (2007) 以疊氮化鈉 ($NaN_3$) 誘變水稻 ‘台農 67 號’ 之突變系，結果分別選育出耐鹽性及感鹽性突變品系。Yen (2011) 由甲基磺酸乙酯 (EMS) 誘變系中亦篩選出 11 個耐鹽品系，其中以 ‘SM75’ 與 ‘SM61’ 兩品系耐鹽性之表現甚至較 ‘Pokkali’ 和 ‘Nona Bokra’ 優良，並發現高耐鹽 ‘SM61’ 品系之耐鹽性是由單一顯性基因所控制，且耐鹽基因與第八對染色體上的分子標幟 RM223 有連鎖關係存在。而 Hsu (2010) 和 Chiou (2011) 從蛋白質體的角度發現有 24 個蛋白質點在 3 種不同耐鹽程度的水稻植株會有不同差異表現，顯示利用化學誘變方法確實可以造成栽培稻在耐逆境下之蛋白質表現發生改變。

本試驗使用經化學誘變所得之耐鹽品系爲材料，透過分子標幟輔助回交育種的方式，將耐鹽特性轉移至秈型稻 ‘IR64’ 中，期建立分子標幟輔助耐鹽水稻育種之模式。並藉此選育耐鹽秈稻新品種，提供非基因轉殖耐鹽品系在育種及分生上之利用，以因應未來氣候變遷下耐鹽逆境之水稻育種、栽培及糧食生產時所需之優良種原。

## 材料和方法

### 試驗材料

**回交族群之建立：**試驗材料爲水稻 ‘台農 67 號’ (*Oryza sativa* L. ‘TNG 67’) 種子經疊氮化鈉誘變，所獲得之 ‘嘉農育 911303 號’ (‘CNY911303’) 品質優良突變系。此品系再以 100 mM EMS 誘變後，於 $M_5$ 世代經由耐鹽性篩選得到耐鹽品系 ‘SM61’，其後再以譜系法純化繁殖得到穩定之耐鹽突變系 ($M_{17}$)。本品系經進行台灣水稻品種權申請之品種性狀表所列 70 個農藝性狀調查，結果發現與 ‘台農 67號’ 並無差異存在，唯田間觀察本品系較 ‘台農 67 號’ 株高約矮 5–7 cm，穗長度亦稍短，生育初期生長速度較爲緩慢。在水耕方式培育時，更發現其根系發育約爲 ‘台農 67 號’ 之一半；經以 100、150、200、250、300 mM 等

不同濃度 NaCl 溶液於五葉齡秧苗期重複進行鹽分逆境處理，‘SM61’ 對逆境之耐受能力接近或優於耐鹽品種 ‘Pokkali’ 及 ‘Nona Bokra’ (均為 3–5 級)。由於 ‘SM61’ 之耐鹽性優良，故乃以其為母本、‘IR64’ 為父本雜交後得到 $F_1$ 種子，再重複與輪迴親本 ‘IR64’ 進行回交，從而建立分子標幟輔助選拔所需 $BC_1F_1$、$BC_2F_1$ 及 $BC_3F_1$ 之各世代材料 (圖 1)。在各回交世代中，其 $BC_1F_1$ 植株有 160 株、$BC_2F_1$ 為 144 株、而 $BC_3F_1$ 世代則有 300 株，各回交世代之植株經 200 mM NaCl 溶液鹽分逆境處理後之存活植株，乃進一步供分子標幟輔助背景選拔，而獲選之植株則移植至田間種植，於抽穗時期供為母本，以進行回交操作。其中，$BC_1F_1$ 及 $BC_2F_1$ 經分子標幟背景選拔之獲選植株 6 株，即由各回交單株其分子標幟基因型分析結果，挑選出與輪迴親 ‘IR64’ 最相似度最高 6 株，供作為母本進行回交。至於 $BC_3F_1$ 獲選之耐鹽植株則於移植田間培育後，經自交所得之 $BC_3F_2$ 後再進行 200 mM NaCl 溶液鹽分逆境處理，其存活植同樣移植於田間供產量試驗，其後再依譜系法繼續純化繁殖成 $BC_3F_3$ 及 $BC_3F_4$ 品系，以供初級、高級產量試驗及不同水稻發育時期耐鹽性之調查利用。

至於對照組傳統回交法之操作 ($TBC_1F_1$、$TBC_2F_1$、$TBC_3F_1$) 與分子標幟輔助選拔者相似 (圖 1)，每一回交世代均取 100 個植株進行 200 mM NaCl 溶液鹽分逆境處理，存活植株再逢機選出 6 株做為母本回交至 ‘IR64’。過程中不進行分子標幟輔助背景選拔，僅於 $TBC_3F_1$ 世代利用 100 個分子標幟進行基因型分析，藉以了解其與 ‘IR64’ 間之遺傳相似度。

**耐鹽品系產量試驗：**(1) 初級產量試驗：分子標幟輔助獲選之 $BC_3F_1$ 世代其經耐鹽處理後存活的植株，經自交後單株收穫之種子繁殖為 $BC_3F_2$ 品系，其 $BC_3F_2$ 品系先進行 200 mM NaCl 溶液耐鹽性評估後，選擇耐鹽性較佳而存活的 $BC_3F_2$ 植株繼續繁衍成 $BC_3F_3$ 品系。而根據各 $BC_3F_2$ 耐鹽等級表現為基礎，分別挑選出 ST1 至 ST20 等 20 個耐鹽之 $BC_3F_3$ 品系供初級產量試驗利用。初級產量試驗於 2011 年二期作進行，每品系種植 100 株，每一品系 4 行植，每行 25 株，行株距為 30 cm × 15 cm，不設重複，於成熟時各品系分別收穫調查稻穀產量表現。(2) 高級產量試驗：初級產量試驗各品系分別收穫 4 株材料 ($BC_3F_4$) 於 2012 年一期及二期作供進行高級產量試驗。其中，在二期作試驗時剔除 ‘ST20’ 品系，改以 ‘IR64’ 作為參試之材料。試驗採用 RCBD (randomized complete block design) 設計，每一品系 4 行植，每行 25 株，行株距為 30 cm × 15 cm，4 重複，於成熟時收穫並調查各品系之小區稻穀產量。

本試驗所有材料之培育及種植，皆於行政院農業委員會農業試驗所之嘉義分所水稻試驗田區進行，其田間管理按一般慣行法栽培。

## 耐鹽性表現調查

**水稻耐鹽性等級之調查：**水稻種子以培養皿殺菌及浸種發芽後，點播於 50 cm × 60 cm 之 80 孔的栽培盤以水耕方式栽培，以 ‘IR64’ 為鹽分敏感型對照品種。秧苗培養液採用改良式木村氏 B 培養液配方 (Kimura B solution) (Yoshida *et al.* 1976)，待全盤幼苗生長至 5–6 葉齡後，乃以含 200 mM NaCl 之水耕液進行鹽分逆境處理，待 ‘IR64’ 鹽害等級達 7 級，即回復至一般水耕液培養，並進行幼苗耐鹽性等級調查。耐鹽等級，則參考 Jwo *et al.* (2008) 修改自 IRRI 在 2002 年所定鹽害分級標準之水稻標準評估系統 (Standard Evaluation System for Rice; SES) 手冊進行 (圖 2)。

**耐鹽品系不同發育時期耐鹽性之調查：**分子標幟輔助篩選並依譜系法繁殖所得之 $BC_3F_2$、$BC_3F_3$ 及 $BC_3F_4$，於 $BC_3F_2$ 與 $BC_3F_3$ 世代，皆重複進行耐鹽性篩選，每一單株之子代挑選出最耐鹽單株繼續繁殖下一世代，最後乃純化得到 ‘ST3’、‘ST12’、‘ST16’、‘ST18’、‘ST59’ 及 ‘ST90’ 等 6 個 $BC_3F_4$ 品系。再分別於三葉齡時期、五葉齡時期、七葉齡時期及最高分蘗期後等 4 個水稻不同生長階段進行鹽份逆境處理，並以耐鹽品系 ‘SM61’ 與敏感型 ‘IR64’ 做為對照。其中，前 3 個發育時期

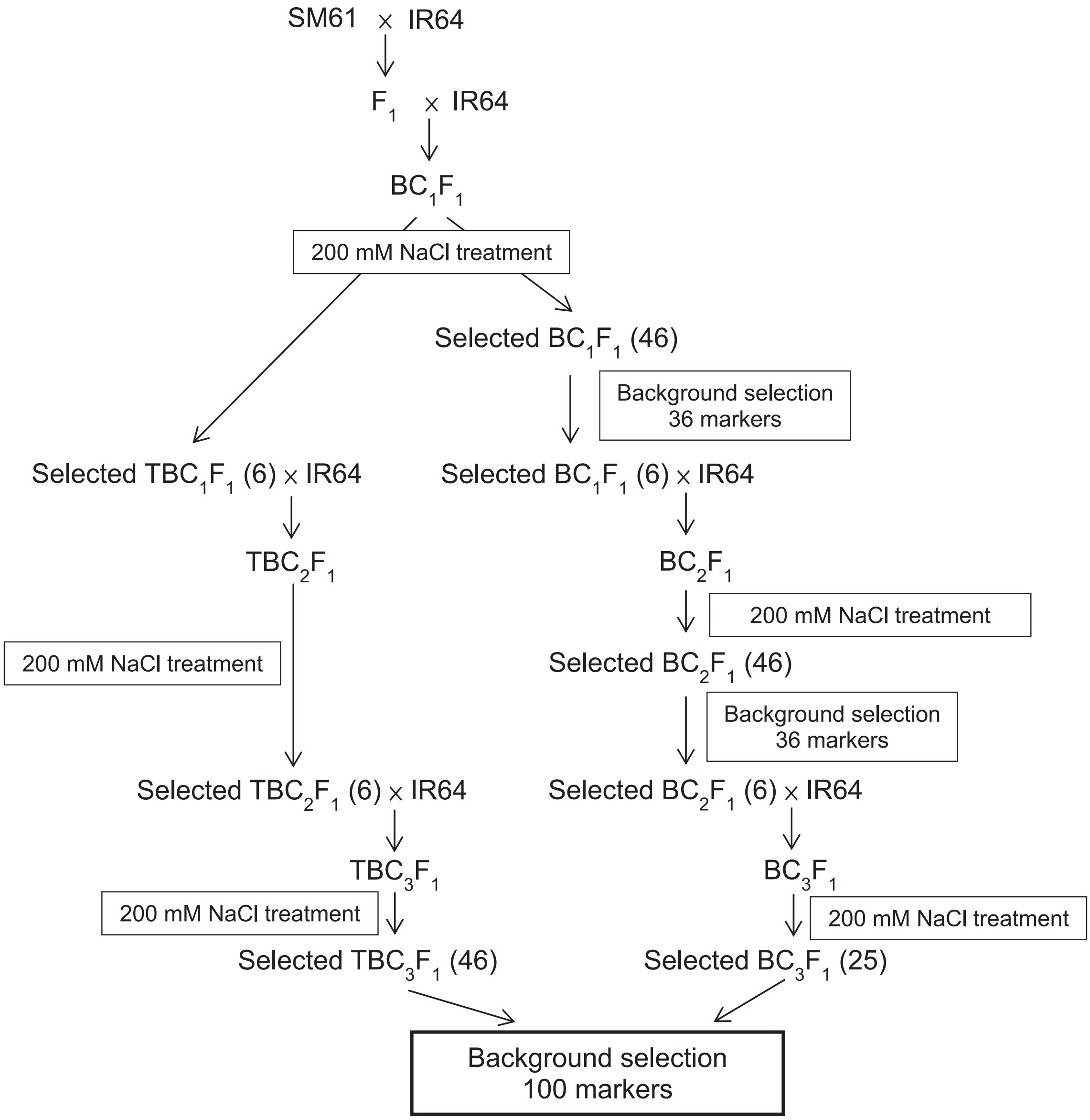


**圖 1.** 培育耐鹽 'IR64' 品系之回交育種流程，包含 200 mM NaCl 鹽分處理及用於背景選拔之分子標幟說明。括弧內數值為每個回交世代所挑選的植株數。

**Fig. 1.** Backcross breeding scheme of salt-tolerant lines 'IR64' with details of the treatment of 200 mM NaCl and markers used for background selection. The numbers of plants selected in each generation are indicated in parentheses.

係利用前述 80 孔栽培盤於不同發育階段以水耕方式進行 200 mM NaCl 溶液鹽分逆境處理；而最高分蘗期之處理，則是利用直徑 26 cm，高度 20 cm 之圓形塑膠桶，於置入 16 cm 高之田土，而將秧苗移植並培育至最高分蘗期，再以 200 mM NaCl 溶液鹽分進行湛水處理，同時維持鹽水液面高於土面 1 cm。所有發育時期之試驗各品系之處理均以 10 株水稻幼苗為一重複單位，試驗二重複，以 RCBD 設計排列，並於植株間表現出差異之起始點開始至植株接近死亡階段，每日進行耐鹽等級調查。

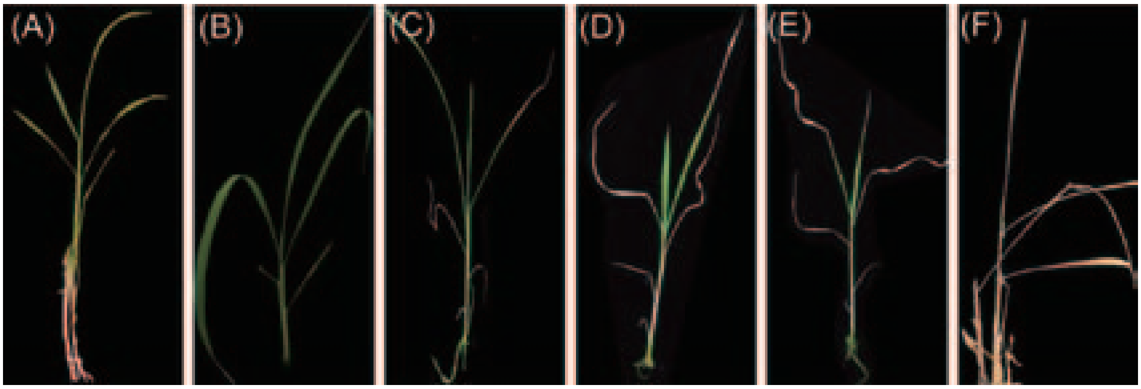


**圖 2.** 水稻秧苗期耐鹽等級調查標準。(A) 植株生長正常，耐鹽等級為 0；(B) 植株葉片捲曲或下位葉黃化，耐鹽等級為 1；(C) 植株葉片先端乾枯白化，耐鹽等級為 3；(D) 植株葉片約 1/2 乾枯白化，耐鹽等級為 5；(E) 植株葉片約 2/3 乾枯白化，耐鹽等級為 7；(F) 植株完全乾枯白化，耐鹽等級為 9。

**Fig. 2.** Standards used for evaluating salt-tolerance in rice seedlings. (A) When plant growth is normal, the scale of salt-tolerance is denoted 0; (B) some leaves are rolled or discolored, the scale of salt-tolerance is denoted 1; (C) some leaf tips are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 3; (D) about 1/2 leaves are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 5; (E) about 2/3 leaves are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 7; (F) and whole plant nearly dead and wilted, the scale of salt-tolerance is denoted 9.

### 分子標幟分析

**水稻基因體之 DNA 萃取及多型性分子標幟篩選：**水稻基因體 DNA 萃取採用 Kazuhiro *et al.* (1998) 發表 benzyl chloride 法之 DNA 萃取方式進行。而分子標幟係挑選 Hsu (2012) 發表之多型性分子標幟資料，挑選兩親本 ‘SM61’ 與 ‘IR64’ 間具多型性的分子標幟進行分析，並搭配自行設計之 indel 分子標幟填補不足位置，而 indel 的設計則是根據 Shen *et al.* (2004) 所發表 indel 存在位置進行相關引設計。

**PCR 反應、電泳分析及基因型判讀：**PCR 反應和電泳分析採用 Liao (2012) 發表的方式進行，於比對子代與親本在 PCR 反應擴增後之 DNA 片段大小，若電泳圖譜僅出現一個 DNA 條帶並與 ‘SM61’ 之條帶相同者，則此子代為同型合子，基因型紀錄為 A；只出現一個 DNA 條帶與 ‘IR64’ 之條帶相同，則此子代亦為同型合子，基因型紀錄為 B；同時出現兩個與兩親本相同之 DNA 條帶的子代，則為異型合子，基因型紀錄為 H。值得注意是，不管是 $BC_1F_1$、$BC_2F_1$ 或 $BC_3F_1$ 回交後代植株，其基因型分析只會出現同型合子 B 或是異型合子 H，若發現有回交後代基因型分析為同型合子 A，則視為自交種子，此單株乃進行淘汰。

**遺傳相似度分析統計與連鎖圖譜之繪製：**將基因型判讀結果利用 GGT graphical genotypes (GGT 2.0)/2007 EDITION 軟體 (http://www.plantbreeding.wur.nl/) 進行分析統計，以計算植株之遺傳相似度。並根據所挑選出在 ‘SM61’ 與 ‘IR64’ 間具備多型性的分子標幟在 RAP-DB 網站 IRGSP/RAP build 5 版所公布的 BAC/PAC 位置，推算換成 IRGSP (The International Rice Genome Sequencing Project) 網站 Build 5 版所公佈 Nipponbare/Kasalath 雜交族群的連鎖圖譜位置，進一步將連鎖圖譜繪出。

## 結果

### 分子標幟輔助耐鹽水稻之選育

**回交世代 ($BC_1F_1$、$BC_2F_1$ 及 $BC_3F_1$) 之分子標幟背景選拔：**各回交世代之秧苗經鹽分逆境處理後，其存活之 46 株秧苗利用分布在水稻 12 條染色體上，共 36 個分子標幟分別進行基因型判讀，其包括 25 個 SSR 分子標幟、4 個 STS 分子標幟及自行設計之 7 個 indel 分

子標幟 (表 1、圖 3)。結果 46 株 $BC_1F_1$ 植株與 'IR64' 的遺傳相似度介於 65–85% 之間，平均約為 75% (圖 4)；其中，與 'IR64' 的相似度較高之 6 株，其與 'IR64' 的遺傳相似度分別為 85.0、82.0、81.9、81.5、81.3 與 81.2%。此 6 個植株進一步移植於田間栽培，並於抽期穗供建立 $BC_2F_1$ 之回交母本使用。同樣在 46 株耐鹽 $BC_2F_1$ 回交後代之背景選拔上，其分子標幟除了重複使用獲選之 6 個 $BC_1F_1$ 之基因型表現異結合之分子標幟外，如第 3 條染色體上的 RM8267、第 7 條染色體上的 RM234、第 8 條染色體上的 RM72、RI08030、SLS188 及第 11 條染色體上的 RM224，另加入不同於 $BC_1F_1$ 背景選拔的 31 個多型性分子標幟，以避免特定基因體片段的重覆篩選，降低背景選拔效率。合計共使用分布在水稻 12 條染色體上的 36 個分子標幟，包括 24 個 SSR 分子標幟與自行設計之 12 個 indel 分子標幟 (表 1、圖 3)，結果 46 株 $BC_2F_1$ 與 'IR64' 的遺傳相似度介於 80.1–98.6% 之間，平均約 89% (圖 4)；其中，有 6 株與 'IR64' 的遺傳相似度較高，其與 'IR64' 的遺傳相似度分別為 98.6、94.9、94.3、94.0、94.0 與 93.9%，挑選此 6 株供做建立 $BC_3F_1$ 之回交母本。最後 $BC_3F_1$ 在經鹽分逆境處理後，乃挑選出 25 株耐鹽 $BC_3F_1$ 回交後代，且為達到涵蓋整個水稻基因體的背景選拔效果，故挑選了 100 個分布於水稻 12 條染色體上的多型性分子標幟，包括 62 個 SSR 分子標幟、9 個 STS 分子標幟及自行設計之 29 個 indel 分子標幟，以此 100 個分子標幟進行 $BC_3F_1$ 回交後代之基因型判讀 (表 1、圖 3)。結果顯示，此 25 株與 'IR64' 的遺傳相似度平均達到 96.4% (圖 4)；其中，編號 1–5 單株之遺傳相似度均達 98% 以上 (表 2)，最高遺傳相似度之單株更可高達 99.2%。結果顯示，此 25 株 $BC_3F_1$ 回交後代之遺傳背景，應已大致回復至輪迴親 'IR64' 之遺傳背景。

**傳統育種回交對照：**在傳統育種回交之對照族群的試驗中，$TBC_1F_1$、$TBC_2F_1$ 及 $TBC_3F_1$ 各世代均只經鹽分逆境處理，而不經分子標幟輔助分析及選拔，並於 $TBC_3F_1$ 世代選取 46 株耐鹽植株，利用 MAS 之 $BC_3F_1$ 植株背景選拔相同之 100 個分子標幟進行背景分析 (表 1、圖 3)。此 46 株與 'IR64' 的遺傳相似度平均達到 93.8% (圖 4)；其中，編號 1–10 之回交單株，其與輪迴親之遺傳相似度可高達 97%。顯示在未經分子標幟輔助背景選拔下，仍可利用傳統回交方式，選育與輪迴親相近之材料，而 $TBC_3F_1$ 世代之各單株分子層次資訊則如表 3 所示。再者，相對於經過 MAS 所選拔之 $BC_3F_1$ 植株的 96.4%，明顯可看出經由分子標幟的輔助選拔，確實有效提高了回交後代恢復輪迴親之速度，有利於耐鹽水稻育種效率和準確性之提升。

## 耐鹽品系不同發育時期耐鹽性之評估

MAS 獲選所得之 6 個 $BC_3F_4$ 品系，分別於三葉齡、五葉齡、七葉齡及最高分櫱期等 4 個時期進行耐鹽性評估，藉以確認耐鹽品系在不同發育時期之耐鹽性穩定性，結果如表 4 所示。在三葉齡時期，處理第 2 日各品系在耐鹽等級上之表現即出現差異，因此開始進行植株耐鹽等級調查直至第 12 日 (圖 5A)。以 10 株植株表現的耐鹽等級取平均值，發現除了品系 'ST12'、'ST18' 和 'ST59'，其餘部分品系在鹽份逆境處理下第 4 日已達到 5 級，而在處理第 7 日後所有品系則皆達到 7 級以上；經由變方分析結果顯示，各品系間耐鹽表現之差異未達顯著水準，顯示品系間並無顯著差異 (表 4)。

在五葉齡時期，植株在第 6 日葉片出現鹽分處理反應差異，故開始進行耐鹽等級調查，調查每日的植株耐鹽等級直至第 17 日 (圖 5B)。然由於環境氣候不穩定，使得所有品系植株在第 6 日耐鹽等級皆表現 3 級以上，敏感型的 'IR64' 更是表現 5 級以上。而在第 9 日，所有品系皆達 5 級以上，'IR64' 則達到了 7 級，並在第 11 日，所有品系皆達到 7 級以上。經由變方分析結果，顯示品系間耐鹽表現差異達顯著水準，分別在第 6、7、8、9、11、15 及 17 日均出現顯著差異。各品系間的耐鹽表現在變方分析達顯著後，繼續進行多

**表 1.** 在 'SM61' 與 'IR64' 間具多型性的分子標幟，其應用於背景選拔之數量。

**Table 1.** The number of polymorphic markers between 'SM61' and 'IR64' used for background selection.

| Backcross generation | Chromosome | Genetic marker | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | SSR | STS | Indel | Subtotal |
| $BC_1$ | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| | 2 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| | 4 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| | 5 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| | 6 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| | 7 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| | 8 | 3 | 0 | 2 | 5 |
| | 9 | 3 | 1 | 0 | 4 |
| | 10 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| | 11 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| | 12 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| | Total | 25 | 4 | 7 | 36 |
| $BC_2$ | 1 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| | 2 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| | 3 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| | 4 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| | 5 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| | 6 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| | 7 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| | 8 | 1 | 0 | 2 | 3 |
| | 9 | 1 | 0 | 2 | 3 |
| | 10 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| | 11 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| | 12 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| | Total | 24 | 0 | 12 | 36 |
| $BC_3$ | 1 | 12 | 2 | 4 | 18 |
| | 2 | 7 | 0 | 4 | 11 |
| | 3 | 6 | 2 | 3 | 11 |
| | 4 | 6 | 1 | 1 | 8 |
| | 5 | 5 | 1 | 2 | 8 |
| | 6 | 4 | 2 | 1 | 7 |
| | 7 | 5 | 0 | 2 | 7 |
| | 8 | 1 | 0 | 7 | 8 |
| | 9 | 3 | 0 | 1 | 4 |
| | 10 | 5 | 0 | 2 | 7 |
| | 11 | 4 | 0 | 1 | 5 |
| | 12 | 4 | 1 | 1 | 6 |
| | Total | 62 | 9 | 29 | 100 |

**圖 3.** 使用於背景選拔之多型性分子標幟。分別使用其中的 36 個分子標幟於 $BC_1F_1$ 背景選拔 (紅色星型)、36 個分子標幟於 $BC_2F_1$ 背景選拔 (藍色星型) 及 100 個分子標幟於 $BC_3F_1$ 背景選拔 (紫色星型)。分子標幟代號 RM 開頭為 SSR 分子標幟，C、R 或 S 為 STS 分子標幟，CH、STS、SLS 或 RI 為 indel 分子標幟。

**Fig. 3.** The polymorphic markers used for background selection. There are thirty-six markers indicated by red stars, 36 markers indicated by blue stars, and 100 markers indicated by purple stars and were applied to $BC_1F_1$, $BC_2F_1$, and $BC_3F_1$, respectively, for background selection. The prefixes RM indicates SSR markers; C, R and S indicate STS markers; CH, STS, SLS and RI indicate indel markers.

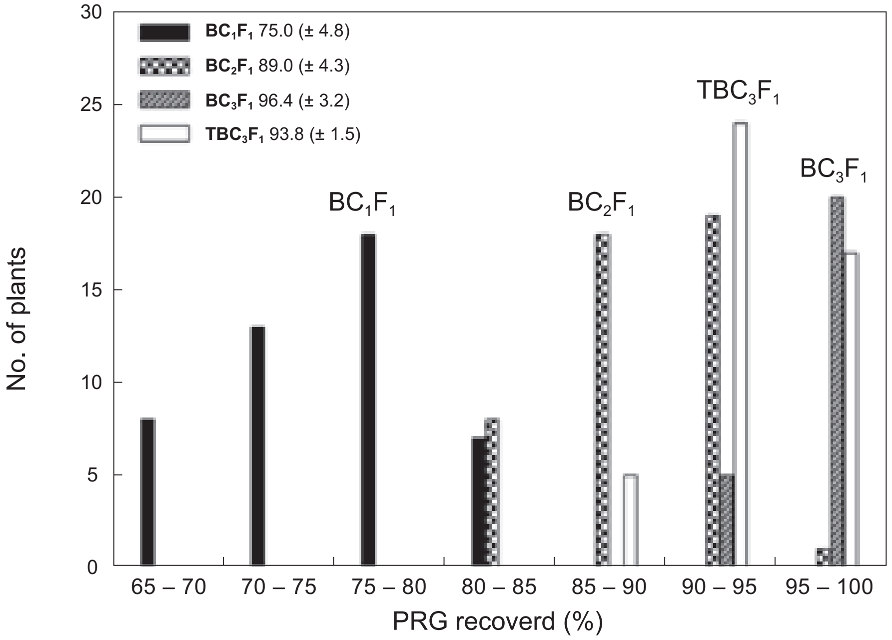


**圖 4.** SM61/IR64 分子標幟輔助回交育種後代族群 $BC_1F_1$、$BC_2F_1$ 和 $BC_3F_1$ 及傳統回交育種後代族群 $TBC_3F_1$ 回復輪迴親 'IR64' 基因體比率之頻率分布。圖形符號右邊之數值為族群平均輪迴親基因體回復比率，括弧內數值為標準差。

**Fig. 4.** The frequency distribution of recurrent parent genome (RPG) recovered rate using marker-assisted backcrossing in $BC_1F_1$, $BC_2F_1$ and $BC_3F_1$ populations and conventional backcrossing in $TBC_3F_1$ population derived from the backcross of 'SM61'/'IR64'. The numbers inside the right side of frame indicate the mean values of RPG recovered (± SD) in each generation.

重比較，結果發現以 'ST18' 耐鹽性表現最佳，而 'ST12'、'ST59' 和 'ST90' 也是偏向表現較佳的耐鹽特性 (表 4)。

在七葉齡時期，植株在第 4 日表現出耐鹽等級差異，故開始進行耐鹽等級調查，調查每日的植株耐鹽等級直至第 15 日 (圖 5C)。所有品系在第 9 日皆達到 5 級以上，在第 13 日達到 7 級以上。經由變方分析結果，顯示品系間耐鹽表現差異達顯著水準，分別在第 5、6、7、9、12 及 13 日出現顯著差異。同樣再經多重比較結果，發現以 'ST12' 和 'SM61' 耐鹽性表現最佳 (表 4)，而在三葉齡和五葉齡時期表現最佳的 'ST18'，雖然在七葉齡不是最佳表現，但是其耐鹽性相對於其他品系，仍是偏向表現較佳的耐鹽特性。最後，植株在快達最高分櫱期時開始停止灌水，等到土面呈現乾枯龜裂後，再開始灌入 200 mM NaCl 的鹽水進行鹽分逆境處理，在第 10 日表現出耐鹽等級差異。開始進行植株耐鹽等級調查直至第 30 日 (圖 5D)，所有品系在第 14 日皆達到 5 級以上，在第 28 日達到 7 級以上，品系 SM61 更在第 30 日達到 9 級，即全部植株完全白化枯死。經由變方分析結果，顯示品系間耐鹽表現差異達顯著水準，而多重比較結果則發現以 'ST18' 和 'ST59' 耐鹽性表現最佳 (表 4)。

綜觀此 6 種耐鹽品系在 4 個水稻不同生長階段對鹽分逆境下的表現，以 'ST18' 為最優良耐鹽品系，在其中 3 個時期都有表現出高耐鹽特性；而耐鹽品系 'SM61' 在七葉齡時期的耐鹽性，表現相對於三葉齡和五葉齡較佳。由初步結果推測，'SM61' 所帶有的耐鹽基因，可能在植株七葉齡時期的鹽分逆境下才開始基因的表現。

表 2. 以 100 個分子標幟於 MAS 分析 $BC_3F_1$ 之基因體組成。

**Table 2.** The genome composition of $BC_3F_1$ by 100 polymorphic markers used for marker-assisted selection (MAS).

| Individual[z] | A (%)[y] | B (%)[x] | H (%)[w] | - (%)[v] | RPG recovered (%) | Total (cM) | Recombinant[u] | H-segment[t] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IR64 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 | 1,359.7 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 98.3 | 1.7 | 0 | 99.2 | 1,359.7 | 3 | 2 |
| 2 | 0 | 97.7 | 2.3 | 0 | 98.9 | 1,359.7 | 3 | 2 |
| 3 | 0 | 96.3 | 3.7 | 0 | 98.2 | 1,359.7 | 3 | 2 |
| 4 | 0 | 96.0 | 4.0 | 0 | 98.0 | 1,359.7 | 4 | 2 |
| 5 | 0 | 96.0 | 4.0 | 0 | 98.0 | 1,359.7 | 3 | 2 |
| 6 | 0 | 95.6 | 4.4 | 0 | 97.8 | 1,359.7 | 4 | 2 |
| 7 | 0 | 96.2 | 2.7 | 1.1 | 97.6 | 1,359.7 | 7 | 3 |
| 8 | 0 | 94.6 | 5.4 | 0 | 97.3 | 1,359.7 | 4 | 2 |
| 9 | 0 | 94.4 | 5.6 | 0 | 97.2 | 1,359.7 | 3 | 2 |
| 10 | 0 | 93.2 | 6.8 | 0 | 96.6 | 1,359.7 | 5 | 3 |
| 11 | 0 | 93.2 | 6.8 | 0 | 96.6 | 1,359.7 | 5 | 3 |
| 12 | 0 | 95.2 | 2.6 | 2.3 | 96.5 | 1,359.7 | 8 | 3 |
| 13 | 0 | 94.5 | 4.0 | 1.6 | 96.5 | 1,359.7 | 4 | 1 |
| 14 | 0 | 93.0 | 7.0 | 0 | 96.5 | 1,359.7 | 9 | 5 |
| 15 | 0 | 93.0 | 7.0 | 0 | 96.5 | 1,359.7 | 4 | 2 |
| 16 | 0 | 92.5 | 7.5 | 0 | 96.3 | 1,359.7 | 4 | 2 |
| 17 | 0 | 92.2 | 7.8 | 0 | 96.1 | 1,359.7 | 5 | 3 |
| 18 | 0 | 90.9 | 9.1 | 0 | 95.5 | 1,359.7 | 10 | 5 |
| 19 | 0 | 91.6 | 7.6 | 0.8 | 95.4 | 1,359.7 | 10 | 4 |
| 20 | 0 | 91.8 | 6.8 | 1.4 | 95.2 | 1,359.7 | 16 | 4 |
| 21 | 0 | 89.7 | 10.3 | 0 | 94.9 | 1,359.7 | 12 | 6 |
| 22 | 0 | 89.5 | 10.5 | 0 | 94.8 | 1,359.7 | 9 | 5 |
| 23 | 0 | 88.9 | 11.1 | 0 | 94.5 | 1,359.7 | 4 | 2 |
| 24 | 0 | 89.0 | 9.4 | 1.6 | 93.7 | 1,359.7 | 7 | 3 |
| 25 | 0 | 87.9 | 11.1 | 0.9 | 93.5 | 1,359.7 | 11 | 5 |
| SM61 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,359.7 | 0 | 0 |

[z] Arranged by the percent of RPG (recurrent parent genome) recovered.
[y] The percent of 'SM61' genome.
[x] The percent of 'IR64' genome.
[w] The percent of heterozygote.
[v] The percent of missing data.
[u] The frequency of cross-over happened in chromosome segment.
[t] Amount of heterozygote in all markers.

## 耐鹽品系初級和高級產量試驗

**初級產量試驗：**在 $BC_3F_2$ 世代經耐鹽處理後存活的植株，移植於田間並經自交後進行單株收穫，由 $BC_3F_2$ 耐鹽性表現挑選出 'ST1' 至 'ST20' 個品系進行初級產量試驗，結果如表 5 所示。此 20 個耐鹽品系中，其稻穀產量表現先換算成每株稻穀收穫重量，再依一般田間種植每公頃 220,000 株數量加乘，得到每品系每公頃的產量。結果各品系產量介於 3,090–6,670 kg $ha^{-1}$，其中以 'ST1'、'ST2'、'ST3'、'ST7'、'ST9'、'ST10'、'ST11'、'ST14'、'ST17' 等 9 個品系稻穀產量均高於 5,000 kg $ha^{-1}$，產量分別為 6,670、6,109、5,990、5,110、5,080、5,790、5,300、5,240

表 3. 以 100 個分子標幟分析 $TBC_3F_1$ 之基因體組成。

**Table 3.** The genome composition of $TBC_3F_1$ by 100 polymorphic markers.

| Individual[z] | A (%)[y] | B (%)[x] | H (%)[w] | - (%)[v] | RPG recovered (%) | Total (cM) | Recombinant[u] | H-segment[t] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IR64 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 | 1,359.7 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 96.7 | 3.3 | 0 | 98.4 | 1,359.7 | 3 | 2 |
| 2 | 0 | 96.3 | 3.7 | 0 | 98.2 | 1,359.7 | 3 | 2 |
| 3 | 0 | 96.0 | 4.0 | 0 | 98.0 | 1,359.7 | 2 | 1 |
| 4 | 0 | 95.6 | 4.4 | 0 | 97.8 | 1,359.7 | 5 | 3 |
| 5 | 0 | 95.4 | 4.6 | 0 | 97.7 | 1,359.7 | 1 | 1 |
| 6 | 0 | 97.2 | 0.8 | 2.0 | 97.6 | 1,359.7 | 5 | 1 |
| 7 | 0 | 95.0 | 5.0 | 0 | 97.5 | 1,359.7 | 5 | 3 |
| 8 | 0 | 94.4 | 5.6 | 0 | 97.2 | 1,359.7 | 2 | 1 |
| 9 | 0 | 94.3 | 5.7 | 0 | 97.2 | 1,359.7 | 8 | 4 |
| 10 | 0 | 94.1 | 5.9 | 0 | 97.1 | 1,359.7 | 6 | 3 |
| 11 | 0 | 93.5 | 6.5 | 0 | 96.8 | 1,359.7 | 7 | 4 |
| 12 | 0 | 93.2 | 6.8 | 0 | 96.6 | 1,359.7 | 4 | 2 |
| 13 | 0 | 93.0 | 7.0 | 0 | 96.5 | 1,359.7 | 9 | 5 |
| 14 | 0 | 92.3 | 7.7 | 0 | 96.2 | 1,359.7 | 8 | 4 |
| 15 | 0 | 92.2 | 7.8 | 0 | 96.1 | 1,359.7 | 9 | 5 |
| 16 | 0 | 91.9 | 8.1 | 0 | 96.0 | 1,359.7 | 8 | 4 |
| 17 | 0 | 92.5 | 6.5 | 1.0 | 95.8 | 1,359.7 | 8 | 3 |
| 18 | 0 | 91.1 | 7.1 | 1.7 | 94.7 | 1,359.7 | 12 | 5 |
| 19 | 0 | 89.0 | 11.0 | 0 | 94.5 | 1,359.7 | 6 | 3 |
| 20 | 0 | 88.9 | 11.1 | 0 | 94.5 | 1,359.7 | 9 | 5 |
| 21 | 0 | 88.3 | 11.7 | 0 | 94.2 | 1,359.7 | 11 | 6 |
| 22 | 0 | 87.8 | 12.2 | 0 | 93.9 | 1,359.7 | 7 | 4 |
| 23 | 0 | 88.6 | 10.0 | 1.4 | 93.6 | 1,359.7 | 9 | 4 |
| 24 | 0 | 86.6 | 13.4 | 0 | 93.3 | 1,359.7 | 8 | 4 |
| 25 | 0 | 86.4 | 13.6 | 0 | 93.2 | 1,359.7 | 8 | 4 |
| 26 | 0 | 88.8 | 8.7 | 2.6 | 93.2 | 1,359.7 | 8 | 3 |
| 27 | 0 | 86.2 | 13.8 | 0 | 93.1 | 1,359.7 | 8 | 4 |
| 28 | 0 | 86.1 | 13.9 | 0 | 93.1 | 1,359.7 | 13 | 7 |
| 29 | 0 | 85.7 | 14.3 | 0 | 92.9 | 1,359.7 | 10 | 5 |
| 30 | 0 | 85.6 | 14.4 | 0 | 92.8 | 1,359.7 | 6 | 3 |
| 31 | 0 | 85.8 | 13.3 | 0.9 | 92.5 | 1,359.7 | 11 | 5 |
| 32 | 0 | 84.6 | 15.4 | 0 | 92.3 | 1,359.7 | 7 | 4 |
| 33 | 0 | 84.5 | 15.5 | 0 | 92.3 | 1,359.7 | 13 | 7 |
| 34 | 0 | 84.1 | 15.9 | 0 | 92.1 | 1,359.7 | 9 | 5 |
| 35 | 0 | 85.7 | 12.2 | 2.1 | 91.8 | 1,359.7 | 11 | 4 |
| 36 | 0 | 89.3 | 4.9 | 5.8 | 91.8 | 1,359.7 | 20 | 5 |
| 37 | 0 | 83.0 | 17.0 | 0 | 91.5 | 1,359.7 | 8 | 4 |
| 38 | 0 | 82.9 | 17.1 | 0 | 91.5 | 1,359.7 | 10 | 5 |
| 39 | 0 | 81.1 | 18.9 | 0 | 90.6 | 1,359.7 | 10 | 5 |

表 3. 以 100 個分子標幟分析 $TBC_3F_1$ 之基因體組成。(續)

**Table 3.** The genome composition of $TBC_3F_1$ by 100 polymorphic markers. (continued)

| Individual[z] | A (%)[y] | B (%)[x] | H (%)[w] | - (%)[v] | RPG recovered (%) | Total (cM) | Recombinant[u] | H-segment[t] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 40 | 0 | 83.2 | 14.2 | 2.6 | 90.3 | 1,359.7 | 9 | 4 |
| 41 | 0 | 83.7 | 12.8 | 3.5 | 90.1 | 1,359.7 | 20 | 6 |
| 42 | 0 | 86.0 | 7.3 | 6.8 | 89.7 | 1,359.7 | 16 | 2 |
| 43 | 0 | 79.1 | 20.9 | 0 | 89.6 | 1,359.7 | 7 | 4 |
| 44 | 0 | 84.0 | 7.7 | 8.3 | 87.9 | 1,359.7 | 18 | 3 |
| 45 | 0 | 74.3 | 24.4 | 1.3 | 86.5 | 1,359.7 | 13 | 6 |
| 46 | 0 | 71.2 | 28.8 | 0 | 85.6 | 1,359.7 | 13 | 7 |
| SM61 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,359.7 | 0 | 0 |

[z] Arranged by the percent of RPG (recurrent parent genome) recovered.
[y] The percent of ‘SM61’ genome.
[x] The percent of ‘IR64’ genome.
[w] The percent of heterozygote.
[v] The percent of missing data.
[u] The frequency of cross-over happened in chromosome segment.
[t] Amount of heterozygote in all markers.

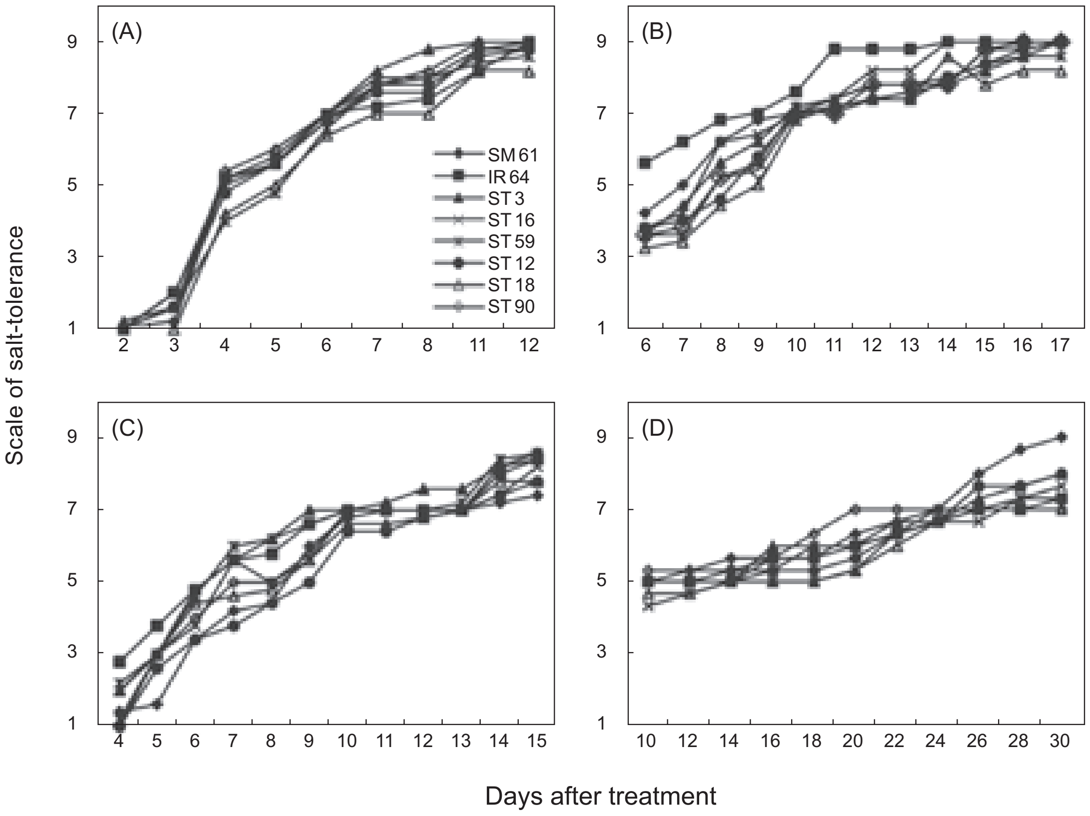


圖 5. 耐鹽品系 ‘SM61’、感鹽品種 ‘IR64’ 及六個 ‘SM61’/‘IR64’ 回交後代 $BC_3F_4$ 耐鹽品系於 (A) 三葉齡；(B) 五葉齡；(C) 七葉齡及 (D) 最高分蘗期後進行 200 mM 氯化鈉鹽分逆境處理下之耐鹽等級變化。

**Fig. 5.** The salt-tolerance scale evaluated by salt-tolerant line ‘SM61’, salt-susceptible variety ‘IR64 and six $BC_3F_4$ salt-tolerant lines derived from the backcross of ‘SM61’/‘IR64’ at (A) three-leaf, (B) five-leaf, (C) seven-leaf, and (D) after maximum tillering stages under the treatment of 200 mM NaCl.

表 4. 'IR64' 和 7 個耐鹽品系於 4 個不同生長期進行 200 mM 氯化鈉鹽份逆境處理下之耐鹽等級表現。

**Table 4.** The scale of salt-tolerance in 'IR64' and seven salt-tolerant lines under the treatment of 200 mM NaCl at four growing stages.

| | | Scale of salt-tolerance[z] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Days after treatment | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage | Line or variety | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| Three-leaf seedling | SM61 | 1.0 | 1.2 | 5.2 | 5.6 | 6.8 | 7.8 | 7.8 | | | 8.6 | 8.8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IR64 | 1.0 | 2.0 | 5.2 | 5.8 | 7.0 | 7.2 | 7.4 | | | 8.2 | 9.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ST3 | 1.2 | 1.6 | 5.2 | 5.6 | 7.0 | 8.2 | 8.8 | | | 9.0 | 9.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ST16 | 1.0 | 2.0 | 5.0 | 5.6 | 7.0 | 8.0 | 8.0 | | | 8.8 | 9.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ST59 | 1.0 | 1.6 | 4.0 | 4.8 | 6.6 | 7.8 | 8.0 | | | 8.4 | 8.6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ST12 | 1.0 | 1.6 | 4.8 | 5.6 | 6.8 | 7.6 | 7.6 | | | 8.8 | 8.8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ST18 | 1.0 | 1.0 | 4.2 | 5.0 | 6.4 | 7.0 | 7.0 | | | 8.2 | 8.2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ST90 | 1.0 | 1.6 | 5.4 | 6.0 | 7.0 | 7.8 | 8.2 | | | 9.0 | 9.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Five-leaf seedling | SM61 | | | | | 4.2 b | 5.0 b | 6.2 ab | 6.8 ab | 7.0 | 7.0 b | 7.4 | 7.6 | 7.8 | 8.8 ab | 8.8 | 9.0 a | | | | | | | | | | | | | |
| | IR64 | | | | | 5.6 a | 6.2 a | 6.8 a | 7.0 a | 7.6 | 8.8 a | 8.8 | 8.8 | 9.0 | 9.0 a | 9.0 | 9.0 a | | | | | | | | | | | | | |
| | ST3 | | | | | 3.6 bc | 4.4 bc | 5.6 bc | 6.2 bcd | 7.2 | 7.4 b | 7.8 | 7.8 | 7.8 | 8.2 bc | 8.6 | 9.0 a | | | | | | | | | | | | | |
| | ST16 | | | | | 3.8 bc | 4.2 bc | 6.2 ab | 6.4 abc | 7.0 | 7.4 b | 8.2 | 8.2 | 9.0 | 9.0 a | 9.0 | 9.0 a | | | | | | | | | | | | | |
| | ST59 | | | | | 3.6 bc | 3.6 c | 5.2 cd | 5.6 def | 7.2 | 7.4 b | 7.8 | 7.8 | 8.0 | 8.4 abc | 8.6 | 8.6 ab | | | | | | | | | | | | | |
| | ST12 | | | | | 3.8 bc | 4.0 bc | 4.6 d | 5.8 cde | 7.0 | 7.2 b | 7.4 | 7.4 | 8.0 | 8.4 abc | 8.8 | 9.0 a | | | | | | | | | | | | | |
| | ST18 | | | | | 3.2 c | 3.4 c | 4.4 d | 5.0 f | 6.8 | 7.2 b | 7.4 | 7.4 | 8.6 | 7.8 c | 8.2 | 8.2 b | | | | | | | | | | | | | |
| | ST90 | | | | | 3.6 bc | 3.8 c | 5.2 cd | 5.4 ef | 7.0 | 7.0 b | 7.8 | 7.8 | 7.8 | 8.8 ab | 9.0 | 9.0 a | | | | | | | | | | | | | |
| Seven-leaf seedling | SM61 | | | 1.4 | 1.6 c | 3.4 c | 4.2 c | 4.4 | 6.0 abc | 6.8 | 7.0 | 7.0 b | 7.0 b | 7.2 | 7.4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IR64 | | | 2.8 | 3.8 a | 4.8 a | 5.6 ab | 5.8 | 6.6 ab | 7.0 | 7.0 | 7.0 b | 7.0 b | 8.0 | 8.4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ST3 | | | 2.0 | 3.0 ab | 4.8 a | 5.6 ab | 6.2 | 7.0 a | 7.0 | 7.2 | 7.6 a | 7.6 a | 8.2 | 8.4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ST16 | | | 1.2 | 3.0 ab | 3.8 bc | 5.6 ab | 5.0 | 5.6 bc | 7.0 | 7.0 | 7.0 b | 7.0 b | 7.4 | 8.2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ST59 | | | 2.2 | 3.0 ab | 4.6 ab | 6.0 a | 6.2 | 6.6 ab | 7.0 | 7.0 | 7.0 b | 7.2 b | 8.4 | 8.6 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ST12 | | | 1.0 | 2.6 b | 3.4 c | 3.8 c | 4.4 | 5.0 c | 6.4 | 6.4 | 6.8 b | 7.0 b | 7.4 | 7.8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ST18 | | | 2.0 | 3.0 ab | 4.4 ab | 4.6 bc | 4.8 | 5.6 bc | 6.6 | 6.6 | 6.8 b | 7.0 b | 7.8 | 7.8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ST90 | | | 1.0 | 3.0 ab | 4.0 abc | 5.0 abc | 5.0 | 5.8 bc | 7.0 | 7.0 | 7.0 b | 7.0 b | 8.2 | 8.6 | | | | | | | | | | | | | | | |
| After maximum tillering | SM61 | | | | | | | | | 5.0 | | 5.3 | | 5.7 | | 5.7 | | 5.7 ab | | 6.3 | | 6.7 | | 7.0 | | 8.0 | | 8.7 | | 9.0 |
| | IR64 | | | | | | | | | 5.0 | | 5.0 | | 5.0 | | 5.7 | | 5.7 ab | | 6.0 | | 6.3 | | 6.7 | | 7.0 | | 7.0 | | 7.3 |
| | ST3 | | | | | | | | | 5.0 | | 5.0 | | 5.0 | | 6.0 | | 6.0 a | | 6.0 | | 6.7 | | 6.7 | | 7.3 | | 7.7 | | 8.0 |
| | ST16 | | | | | | | | | 4.3 | | 4.7 | | 5.0 | | 5.3 | | 6.0 a | | 6.0 | | 6.3 | | 6.7 | | 6.7 | | 7.3 | | 7.7 |
| | ST59 | | | | | | | | | 5.0 | | 5.0 | | 5.0 | | 5.0 | | 5.0 c | | 5.3 | | 6.3 | | 7.0 | | 7.0 | | 7.3 | | 7.3 |
| | ST12 | | | | | | | | | 5.0 | | 5.0 | | 5.3 | | 5.3 | | 5.3 bc | | 5.7 | | 6.3 | | 6.7 | | 7.7 | | 7.7 | | 8.0 |
| | ST18 | | | | | | | | | 4.7 | | 4.7 | | 5.0 | | 5.0 | | 5.0 c | | 5.3 | | 6.0 | | 6.7 | | 7.0 | | 7.0 | | 7.0 |
| | ST90 | | | | | | | | | 5.3 | | 5.3 | | 5.3 | | 5.7 | | 6.3 a | | 7.0 | | 7.0 | | 7.0 | | 7.0 | | 7.0 | | 7.0 |

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

**表 5.** 2011 年二期作 20 個耐鹽品系初級稻穀試驗之稻穀產量表現。

**Table 5.** The grain yield of twenty rice salt-tolerant lines in preliminary yield trial in the second cropping season of 2011.

| Line | Grain yield (kg $ha^{-1}$) | Line | Grain yield (kg $ha^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| ST1 | 6,670 | ST11 | 5,300 |
| ST2 | 6,100 | ST12 | 4,750 |
| ST3 | 5,990 | ST13 | 4,460 |
| ST4 | 3,090 | ST14 | 5,240 |
| ST5 | 4,700 | ST15 | 4,790 |
| ST6 | 4,580 | ST16 | 4,550 |
| ST7 | 5,110 | ST17 | 5,710 |
| ST8 | 4,760 | ST18 | 4,950 |
| ST9 | 5,080 | ST19 | 4,670 |
| ST10 | 5,790 | ST20 | 3,110 |

及 5,710 kg $ha^{-1}$，為產量潛能較高之品系，並以 'ST1' 及 'ST2' 為最高產品系。而 'ST4' 及 'ST20' 之稻穀產量，僅為 3,090 kg $ha^{-1}$ 及 3,110 kg $ha^{-1}$，係 20 個耐鹽品系中較為低產潛能者。另外，於耐鹽性最優良的品系 'ST18'，其產量亦達 4,950 kg $ha^{-1}$。

**高級產量試驗：**20 個耐鹽品系一期作之高級產量試驗結果如表 6 所示，其稻穀產量表現介於 5,160 kg $ha^{-1}$ 至 7,530 kg $ha^{-1}$，其中以 'ST1'、'ST2'、'ST3'、'ST4'、'ST5'、'ST9'、'ST10'、'ST11'、'ST12'、'ST14'、'ST16'、'ST20' 等 12 個品系之稻穀產量高於 6,000 kg $ha^{-1}$ 以上，係稻穀產量潛能較佳之品系，並以 'ST2' 及 'ST5' 兩品系之稻穀產量最高，分別可達到 7,530 及 7,400 kg $ha^{-1}$；而 'ST18'、'ST19' 兩品系之稻穀產量分別為 5,160 kg $ha^{-1}$ 及 5,230 kg $ha^{-1}$，其是 20 個耐鹽品系中稻穀產量表現較差異之品系。

20 個耐鹽品系二期作之高級產量試驗結果，同樣如表 6 所示，其稻穀產量表現介於 4,660 至 7,370 kg $ha^{-1}$。其中，除 'ST4' 之稻穀產較低外，僅 4,660 kg $ha^{-1}$，其餘 18 個耐鹽品系之稻穀產量均高於 5,000 kg $ha^{-1}$ 以上，並以 'ST2'、'ST5'、'ST9'、'ST15'、'ST17' 等 5 個品系之稻穀產量高於 6,000 kg $ha^{-1}$ 以上，係稻穀產量潛能較佳之品系。更以 'ST2' 品系之稻穀產量最高，達到 7,370 kg $ha^{-1}$，而輪迴親親本 'IR64' 稻穀產量為 7,090 kg $ha^{-1}$。

**耐鹽回交品系與 IR64 性狀間之差異：**1012 年二期同時種植 'ST12'、'ST18' 及 'IR64' 各 750 株，二重複，進行台灣水稻品種權申請時於品種性狀表中所之 70 個性狀，藉以了解育成回交育成品系與輪迴親在農藝特性間差異。

# 討論

## 分子標幟輔助選拔

一般傳統回交育種在族群數量龐大的情況下，回交後代植株基因型在 $BC_1$ 世代回復到輪迴親基因體的比率為 75%，在 $BC_2$ 世代為 87.5%，在 $BC_3$ 世代為 93.8%。但在實際回交育種操作過程中，通常會因族群數量較小或親本遺傳背景較遠，使得回交世代回復到輪迴親基因體的比率較理論值低 (Collard *et al.* 2005)。本試驗傳統回交育種結果，在 $BC_3$ 世代回復到輪迴親基因體的比率為 93.8%，剛好達到了預期的結果，代表所使用的回交後代數量是足夠的。

Frisch *et al.* (1999, 2000) 藉由玉米 (*Zea mays* L.) 基因圖譜上的 80 個分子標幟，利用 PLABSIM 程式模擬玉米族群在回交過程中，將貢獻親本上的一個目標對偶基因轉入輪迴親本之輪迴親基因體回復比率。結果指出，利用分子標幟輔助回交育種的輪迴親基因體回復比率，遠高於一般傳統回交育種；再從模擬曲線圖來看，分子標幟輔助回交育種的輪迴親基因體回復比率在 $BC_1$ 世代約 72%、$BC_2$ 世代約 88%、$BC_3$ 世代約 95%，而本試驗結果為在 $BC_1$ 世代約 75%、$BC_2$ 世代約 89%、$BC_3$ 世代約 96.4%。顯示 3 個回交世代皆達到了預期的比率，代表回交後代數量及所使用於背景選拔的分子標幟數量是足夠的。另外，由 Collard *et al.* (2005) 報告指出，一般傳統回交育種至少需經過 6 至 8 次的回交，才能夠幾乎回復到輪迴親的基因體，但藉由分子標幟輔助回交育種，只需回交 4 次或 3

表 6. 2012 年一期作 20 個耐鹽品系及二期作 ‘IR64’ 和 19 個耐鹽品系高級試驗之稻穀產量表現。

**Table 6.** The grain yield of 20 salt-tolerant lines and ‘IR64’ and 19 salt-tolerant lines in advanced yield trials in the first and second cropping season of 2012.

| Line | Grain yield of 1st crop (kg $ha^{-1}$)[z] | Grain yield of 2nd crop (kg $ha^{-1}$)[z] |
|---|---|---|
| ST1 | 6,950 abc | 5,690 bcde |
| ST2 | 7,530 a | 7,370 a |
| ST3 | 6,590 abcdef | 5,980 bcd |
| ST4 | 6,010 cdefghi | 4,660 f |
| ST5 | 7,400 ab | 6,310 b |
| ST6 | 5,840 defghi | 5,870 bcd |
| ST7 | 5,730 fghi | 5,760 bcde |
| ST8 | 5,530 ghi | 5,300 def |
| ST9 | 6,260 cdefg | 6,090 bcd |
| ST10 | 6,760 abcde | 5,760 bcde |
| ST11 | 6,800 abcd | 5,640 bcde |
| ST12 | 6,510 bcdefg | 5,300 def |
| ST13 | 5,760 efghi | 5,010 ef |
| ST14 | 6,160 cdefghi | 5,900 bcd |
| ST15 | 5,990 cdefghi | 6,240 bc |
| ST16 | 6,770 abcd | 5,860 bcd |
| ST17 | 5,830 defghi | 6,360 b |
| ST18 | 5,160 i | 5,430 cde |
| ST19 | 5,230 hi | 5,870 bcd |
| ST20 | 6,180 cdefgh | - |
| IR64 | - | 7,090 a |

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

次，甚至 2 次就可以達到此目標。故本研究預計回交 3 次的 $BC_3F_1$ 回交後代，應已回復到接近輪迴親 IR64 的基因體，所以試著增加分子標幟至 100 個，以期達到涵蓋整個水稻基因體的背景選拔。而由 25 株的 $BC_3F_1$ 回交後代基因型分析結果得知，其與 ‘IR64’ 的遺傳相似度平均達到 96.4%，其中最高單株更高達 99.2%。顯示此 25 株 $BC_3F_1$ 回交後代，確實幾乎回復到 ‘IR64’ 的基因體。這些回交後代目前已繁殖至 $BC_3F_5$ 世代，利用譜系法將單株純化繁殖成固定品系，在剔除異型結合之植株及持續純化後，透過田間實際的產量評估試驗，可了解這些獲選品系在栽培上的實用性。

Cheng *et al.* (2012) 利用耐鹽粳稻品種 ‘Xiushui09’ 與不耐鹽秈稻品系 ‘IR2061-520-6-9’ 雜交的 $BC_2F_6$ 回交後代族群進行 QTLs 之圖譜定位，並藉由比較同一基因體背景，但在 QTLs 上帶有不同親本對偶基因的植株後代，其對偶基因在耐鹽性表現的貢獻上所顯現之差異。未來也可利用本試驗上的回交後代品系，進行耐鹽 QTLs 圖譜定位，期能定位並選殖出與耐鹽相關的基因。

## 耐鹽品系不同發育時期耐鹽性之評估

Jwo *et al.* (2008) 針對 TNG 67 誘變品系在秧苗期約達 3 至 4 葉齡時期進行耐鹽性篩選，結果顯示水稻不同品種 (系) 對於鹽分逆境之反應不甚一致。部分品系在鹽分逆境早期有反應，部分則是反應在後期，而大部分品系鹽分逆境處理在第 5–7 d 與第 11–14 d 間產生劇烈轉折變化，鹽害指數由原先較低的

情形快速升高。本試驗同樣的在秧苗期約 3 葉齡時期進行耐鹽性篩選，結果發現鹽害指數則無明顯表現在特定時間點，但有偏向鹽害指數表現在秧苗早期發生較嚴重之情況。顯示水稻植株耐鹽性的表現，會因生育期不同而有所影響。究其原因，Jwo *et al.* (2008) 在整個測試過程所使用之鹽分逆境僅 150 mM NaCl，且測試期間達 21 日，在 21 日的過程中可能因參試材料的生長、發育或修復機制不同，故容易造成二個不同鹽害反應時期的轉折變化。而本次試驗以較高之 200 mM NaCl 鹽分逆境在 12 日完成，由於鹽分逆境相對較高，植株受傷較重。因此參試材料繼續生育、發育或修復損傷之情形，相對會減少，故調查過程之耐鹽等級表現較不會發生劇烈轉折變化的現象。

檢視參試 8 個品種 (系) 的耐鹽表現來看，在 5 葉齡、7 葉齡及最高分櫱期後鹽分逆境處理結果，顯示 ‘ST12’、‘ST18’ 及 ‘ST59’ (7 葉齡除外) 等 3 個品系在耐鹽性有不錯之表現，較之對照品種 ‘IR64’ 的表現均有明顯的差異。尤其 ‘SM61’ 因初期發育較慢，雖已提早 7 日育苗，於植株達到適當葉齡後所進行之耐鹽測試，其所表現之耐鹽反應仍不及分子標幟選育之 ‘ST12’、‘ST18’ 及 ‘ST59’ 等 3 個品系。又因 ‘SM61’ 之根系發育較小，故帶有耐鹽基因之 MAS 回交品系，諸如 ‘ST12’、‘ST18’ 及 ‘ST59’ 可能因根系發育優於貢獻親，使得其在鹽分逆境之耐受能力表現上優於 ‘SM61’。試驗結果顯示，回交品系在背景為秈稻的基礎下，由於生長勢、農藝特性及根系較為優良，使得獲選品系有超越貢獻親耐鹽性的情形發生，大幅提高了 MAS 及傳統回交育種獲選之耐鹽品系之實用性。

回交後代品系之耐鹽性表現，在不同生育時期超越貢獻親 (‘SM61’) 之表現，其耐鹽性之超越親本的現象是否可能是因 ‘SM61’ 的基因組與 ‘IR64’ 基因組產生互補所造成，抑或是耐鹽基因 ‘IR64’ 遺傳背景存在轉錄、調節等因子，形成增加 ‘SM61’ 耐鹽基因的表現。其關於前者，由於目前並無報告指出耐鹽品種雜交回交後代因基因組互補而產生耐鹽性增加的報告，因此本研究分子標幟輔助導入耐鹽性結果，只能推論因 ‘SM61’ 的耐鹽基因導入 ‘IR64’，故造成 ‘IR64’ 回交品系出現耐鹽性。惟從大部分耐旱性 QTLs 圖譜定位的研究中，發現在秈稉稻雜交族群中，經圖譜定位到之 QTLs 對耐旱性之正向貢獻主要來自稉稻。原因係稉型稻於少雨地區栽培，故而其遺傳形質上較為耐旱 (Wang *et al.* 1994; Redona & Mackil 1996; Yano & Sasaki 1997)。由此逆境特性 QTLs 結果推論，似乎不同基因組的互補對逆境特性表現產生正向影響，具有相當可能性。惟是否 ‘IR64’ 遺傳背景存在可增進 ‘SM61’ 的耐鹽基因表現，仍有待再進一步試驗確認。然由不同回交品系之耐鹽特性有些較強 (3 級)，但有些品系之表現為 5 級觀之，未來應可以不同耐鹽性等級之回交品系，再進一步進行回交，以育成 ‘IR64’ 不同耐鹽等級同源系 (isogenic line)。在剔除回交品系於農藝特性表現差異之因素後，其同源系在耐鹽性上所表現之差異，將可清楚歸類為 ‘IR64’ 遺傳背景與 ‘SM61’ 耐鹽基因間之交感效應或互補性所造成。

水稻耐鹽性在秧苗期和生殖生長期是由不同機制所控制 (Moradi *et al.* 2003)，目前最為人所知的耐鹽 *Saltol* QTL 和 *SKC1* 基因都是在秧苗期表現，而本試驗也主要針對水稻秧苗期的耐鹽性表現進行觀察。所以，未來必須結合在水稻不同生長期表現耐鹽性的 QTLs，以因應水稻於實際田間完整生育期對耐鹽環境變化的適應。

## 耐鹽品系產量比較試驗

台灣水稻一期作稻穀產量約介於 5,000–7,000 kg $ha^{-1}$，而二期作則介於 4,000–6,000 kg $ha^{-1}$。一般而言，一期作稻穀產量較高，產量平均約 6,000 kg $ha^{-1}$，而二期作較為減少，稻穀產量約 5,000 kg $ha^{-1}$。在耐鹽品系初級產量試驗中，發現 20 個耐鹽品系的產量僅 9 個品系達到 5,000 kg $ha^{-1}$ 以上的標準，即 ‘ST1’、‘ST2’、‘ ST3’、‘ST7’、‘ST9’、‘ST10’、‘ST11’、‘ST14’ 和 ‘ST17’，而超過一半以上的試驗品系 (11 個品系) 未達到此一產量標準；

其中，更以 ‘ST4’ 和 ‘ST20’ 兩品系產量最低，產量僅約 3,000 kg $ha^{-1}$。推測可能原因在於初級產量試驗時，由於水稻穀粒充實時期發生嚴重田間病蟲害，導致稻穀產量減少，植株稔實率偏低，致使各耐鹽品系之產量無法充分表現。另一個可能原因，係分子輔助回交過程可能由於部分與高產相關之基因可能被遺失，而未回復至 ‘IR64’ 基因體，致使產量潛能相對偏低。這些低產品系，未來仍有待進一步改進產量表現，方能進行實際利用。

在耐鹽品系的高級產量比較試驗中，各品系之水稻植株在田間生長正常，病蟲害發生率低。經試驗結果得知，全部 20 個品系的稻穀產量皆達到 5,000 kg $ha^{-1}$ 以上，其中有 12 品系之稻穀產量均高於 6,000 kg $ha^{-1}$；以 ‘ST2’ 及 ‘ST5’ 最具高產潛能，而 ‘ST2’ 之稻穀產量高達 7,530 kg $ha^{-1}$，顯示已具有實際栽培價值。至於二期作產量表現，雖然大部分品系均達 5,000 kg $ha^{-1}$，雖亦具有實際栽培價值，然與輪迴親 ‘IR64’ 相較，乃僅 ‘ST2’ 與 ‘IR64’ 稻穀產量差異不顯著，其餘耐鹽品系之稻穀產量表現仍低於輪迴親 ‘IR64’。進一步對照高級產量試驗可知，‘ST2’、‘ST3’ 及 ‘ST5’ 等 3 個品系在兩期作均表現高產，顯示此 3 個品系未來適合在台灣地區兩期作栽培利用，尤其 ‘ST2’ 兩期作之稻穀產量表現均為最佳，顯示其具有相當高產的潛能，實用栽培價值令人期待。

上述耐鹽品系產量試驗結果符合吾人之期望，顯示可藉由回交育種方式快速育成耐鹽品系。固然增加耐鹽特性的過程中，可能會使得稻穀產量稍有降低情形，然所選育之品系大部分均可達到實用栽培之價值。因此，展望未來台灣水稻耐逆境育種，應可循此模式於 3–4 年內選育出適合國內栽培利用之耐逆境水稻新品種，以因應全球暖化下糧食生產需求。再者，在耐鹽品系 ($BC_3F_4$) 不同發育時期耐鹽性評估試驗中，以 ‘ST12’ 及 ‘ST18’ 之耐鹽性表現較佳，然由高級產量試驗中卻發現兩品系之稻穀產量表現不如預期，究其原因是否在分子標幟輔助回交過程中發生產量相關基因的遺失而無法表現產量潛能，或由於產量試驗係於正常水田無鹽分影響情形下進行，致使高耐鹽品系諸如 ‘ST12’ 及 ‘ST18’ 之產量潛能因評估環境為非鹽化田，致使其優良特性無法充份發揮，尚待進一步觀察、測試與釐清。

綜合各品系在不同發育時期表現出優良耐鹽性，且產量試驗稻株發育正常並具有不錯的產量表現來看，本研究確已利用分子標幟輔助回交的方式，於短期內有效進行耐鹽性之轉移及選育工作。因此，可提供國內未來於架構水稻耐逆境育種之策略與操作時參考與利用，尤其國內西部沿海或部分超抽地下水導致海水鹽分入侵之土地，諸如台南地區之學甲、將軍、北門及鰲鼓等接近海岸地區。這些土地由於鹽化影響，導致相當比率土地無法種植農作物，若能以選育之耐鹽品系直接於鹽化土地進行產量及實用性測試，進一步確認其等實用性，即可培育出耐鹽水稻新品種。本研究選育所得之耐鹽品系，未來於台灣鹽化土地之栽培利用，具有令人期待之前景。

## 引用文獻


Ashikari, M., H. Sakakibara, S. Lin, T. Yamamoto, T. Takashi, A. Nishimura, E. R. Angeles, Q. Qian, H. Kitano, and M. Matsuoka. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. Science 309:741–745.

Cheng, L., Y. Wang, L. Meng, X. Hu, Y. Cui, Y. Sun, L. Zhu, J. Ali, J. Xu, and Z. Li. 2012. Identification of salt-tolerant QTLs with strong genetic background effect using two sets of reciprocal introgression lines in rice. Genome 55:45–55.

Chiou, L. W. 2011. Root Comparative Proteomic Analysis of Initial Salt-Stressed Rice Seedlings TNG67 and Its Salt-Sensitive Mutant SA0604, Salt-Tolerant Mutant SM75. Master Thesis. Graduate Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 106 pp. (in Chinese with English abstract)

Collard, B. C. Y. and D. J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Phil. Trans. R. Soc. B 363:557–572.

Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, and E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142:169–196.

Collard, B. C. Y., C. M. Vera Cruz, K. L. McNally, P. S. Virk, and D. J. Mackill. 2008. Rice molecular breeding laboratories in the genomics era: Current status and future considerations. Intl. J. Plant Genomics 2008:524–547.

Courtois, B. and R. Lafitte. 2003. Using marker-aided selection for a specific drought-tolerance trait. p.84–90. *in*: Breeding Rice for Drought-Prone Environments. (Fischer, K. S., R. Lafitte, S. Fukai, G. Altin, and B. Hardy, eds.) International Rice Research Institute. Los Baños. 98 pp.

Frisch, M., M. Bohn, and A. E. Melchinger. 1999. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. Crop Sci. 39:1295–1301.

Frisch, M., M. Bohn, and A. E. Melchinger. 2000. PLABSIM: Software for simulation of marker-assisted backcrossing. J. Hered. 91:86–87.

Hittalmani, S., A. Parco, T. V. Mew, R. S. Zeigler, and N. Huang. 2000. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. Theor. Appl. Genet. 100:1121–1128.

Hsu, J. H. 2012. The Platform of Polymorphic Markers and Genetic Mapping of a Drought Tolerance Gene at Seedling Stage in Rice. Master Thesis. Graduate Institute of Agronomy, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 98 pp. (in Chinese with English abstract)

Hsu, Y. K. 2010. Comparative Proteomic Analysis of Initial Salt-stressed Rice Seedlings TNG 67 and its Salt-sensitive Mutant SA0604, Salt-tolerant Mutant SM75. Master Thesis. Graduate Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 128 pp. (in Chinese with English abstract)

International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. Nature 436:793–800.

Jwo, W. S. 2007. Physiological Characterizations of Salt Tolerance at Germaination and Seedling Stages in Rice (*Oryza sativa* L.) Tainung 67 Mutants. Master Thesis. Master Programs of Life Sciences, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 122 pp. (in Chinese with English abstract)

Jwo, W. S., C. G. Chern, M. H. Lai, H. M. Yen, T. H. Tseng, and H. E. Yen. 2008. Screening technique for salt tolerance in the rice seedling stage. J. Taiwan Agric. Res. 57:193–204. (in Chinese with English abstract)

Kazuhiro, K., Y. Niwa, T. Yamaguchi, H. Sunohara, H. Hirano, and M. Umeda. 1998. A rapid and easy-handling procedure for isolation of DNA from rice, *Arabidopsis* and tobacco. Plant Biotechnol. 15:45–48.

Khush, G. S. and D. S. Brar. 2002. Biotechnology for rice breeding: progress and impact. p.41–58. *in*: Proceedings of the 20th Session of the International Rice Commission: Sustainable Rice Production for Food Security. July, 23–26, 2002. Bangkok, Thailand. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

Khush, G. S. 2005. What it will take to feed five billion rice consumers in 2030. Plant Mol. Biol. 59:1–6.

Liao, Y. N. 2012. The Genetic Analysis and Coarse Mapping of the Rice Floury Gene, *FLOURY ENDOSPERM6* (*FLO6*). Master Thesis. Graduate Institute of Agronomy, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 73 pp. (in Chinese with English abstract)

Moradi, F., A. M. Ismail, G. B. Gregorio, and J. A. Egdane. 2003. Salinity tolerance of rice during reproductive development and association with tolerance at the seedling stage. Ind. J. Plant Physiol. 8:105–116.

Myint, K. K. M., D. Fujita, M. Matsumura, T. Sonoda, A. Yoshimura, and H. Yasui. 2012. Mapping and pyramiding of two major genes for resistance to the brown planthopper [*Nilaparvata lugens* (Stål)] in the rice cultivar ADR52. Theor. Appl. Genet. 124:495–504.

Neeraja, C. N., R. Maghirang-Rodriguez, A. Pamplona, S. Heuer, B. C. Y. Collard, E. M. Septiningsih, G. Vergara, D. Sanchez, K. Xu, A. M. Ismail, and D. J. Mackill. 2007. A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. Theor. Appl. Genet. 115:767–776.

Redona, E. D. and D. J. Mackil. 1996. Mapping quantitative trait loci for seedling vigor in rice using RFLPs. Theor. Appl. Genet. 92:395–492.

Sharma, P. N., A. Torii, S. Takumi, N. Mori, and C. Nakamura. 2004. Marker-assisted pyramiding of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance genes *Bph1* and *Bph2* on rice chromosome 12. Hereditas 140:61–69.

Shen, Y.J., H. Jiang, J. P. Jin, Z. B. Zhang, B. Xi, Y. Y. He, G. Wang, C. Wang, L. Qian, X. Li, Q. B. Yu, H. J. Liu, D. H. Chen, J. H. Gao, H. Huang, T. L. Shi,

and Z. N. Yang. 2004. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. Plant Physiol. 135:1198–1205.

Singh, R. K. and B. Mishra. 2004. Role of central soil salinity research institute in genetic improvement of rice varieties in India. p.189–242. *in*: Genetic Improvement of Rice Varieties in India. (Sharma, S. D. and U. P. Rao, eds.) Today & Tomorrows Printers and Publishers. New Delhi. 1251 pp.

Thomson, M. J., M. de Ocampo, J. Egdane, M. A. Rahman, A. G. Sajise, D. L. Adorada, E. Tumimbang-Raiz, E. Blumwald, Z. I. Seraj, R. K. Singh, G. B. Gregorio, and A. M. Ismail. 2010. Characterizing the *saltol* quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. Rice 3:148–160.

Wang, G. L., D. J. Mackill, J. M. Bonman, S. R. McCouch, M. C. Champoux, and R. J. Nelson. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics 136:1421–1434.

Yen, C. C. 2011. Mutagenetic Breeding and Linkage-Marker Analyses of Salt-Tolerant Rice. Doctoral Dissertation. Department of Life Science, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 141 pp. (in Chinese with English abstract)

Yano, M. and T. Sasaki. 1997. Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice. Plant Mol. Biol. 35:145–153.

Yoshida, S. 1976. Routine procedures for growing rice plants in culture solution. p.61–66. *in*: Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. (Yoshida, S., D. A. Forno, J. H. Cook, and K. A. Gomez, eds.) International Rice Research Institute, Manilla. 83 pp.

# Marker-Assisted Selection of Salt Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.)

Su-Chen Kuo[1], Chieh-Wei Kuo[2], Yann-Rong Lin[3], and Yong-Pei Wu[4,*]

## Abstract

Kuo, S. C., C. W. Kuo, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2013. Marker-assisted selection of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). J. Taiwan Agric. Res. 62(2):137–156.

The salt-tolerant mutant line 'SM61' was crossed to IR64, an elite *indica* variety which is widely grown in the world, to introgress gene(s) conferring salt tolerance to 'IR64' as the recurrent parent by backcrossing. The progenies of each backcross generation were screened salt tolerance by the treatment of 200 mM NaCl and consequently selected by markers for background selection to recover the recurrent parent's genome. The means of recurrent parent's genome were 75.0, 89.0 and 96.4% in selected $BC_1F_1$, $BC_2F_1$ and $BC_3F_1$ individuals, respectively. As compared to the mean recovery genome of $BC_3F_1$ plants by conventional backcrossing was 88.4%, background selection by marker-assisted selection (MAS) was more efficient to breed salt-tolerant lines. 'SM61', 'IR64' and six $BC_3F_4$ salt-tolerant lines derived from the backcross of 'SM61'/'IR64' were evaluated for salt tolerance under the treatment of 200 mM NaCl at three-leaf, five-leaf, seven-leaf, and after maximum tillering stages. Three salt-tolerant lines, 'ST12', 'ST18' and 'ST59', exhibited higher tolerance to salt stress than both the donor parent and the recurrent parent did, implying that the salt-tolerant characteristic of 'SM61' was successfully transferred to 'IR64' and generated new high salt-tolerant *indica* lines by MAS. In addition, the grain yields of twenty salt-tolerant $BC_3F_4$ lines were produced more than 5,000 kg per hectare, indicating that these twenty salt-tolerant lines can be grown in fields for cultivation. Hopefully these salt-tolerant lines will be registered as new rice varieties and be available for rice production on saline fields locally and internationally.

**Key words:** Marker-assisted selection (MAS), Mutant lines, Salt-tolerant Rice.

---

Received: January 30, 2013; Accepted: April 12, 2013.

* Corresponding author, e-mail: wuypei@dns.caes.gov.tw

1 Research Assistant, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

2 Assistant Professor, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

3 Associate Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

4 Associate Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(2):157–164 (2013)
DOI:10.6156/JTAR.2013.06201.05

# 火鶴花切花低溫貯運寒害生理之研究

黃肇家[1,*] 黃慧穗[2] 蔡金玉[2]

## 摘要

黃肇家、黃慧穗、蔡金玉。2012。火鶴花切花低溫貯運寒害生理之研究。台灣農業研究 62(2):157–164。

為探討火鶴花切花低溫貯運寒害之反應，本研究將 ‘丘比特’ 火鶴花 (*Anthurium andraeanum* L. ‘Tropical’) 切花放置於 7℃、12℃及 17℃貯藏 7 d，測定貯藏結束後及移到常溫 (20℃) 瓶插時之切花品質、吸水率與呼吸率等之變化。結果顯示，切花於 7℃貯藏結束時，佛燄苞已褪色，移溫後，佛燄苞與肉穗花序色澤快速轉為褐色，花莖則於瓶插後期才開始劣化；12℃貯藏者於瓶插 6 d 後，佛燄苞與肉穗花序才略有加快劣化之趨勢；17℃貯藏者品質一直維持良好。7℃貯藏者於瓶插時吸水率與鮮重大幅下降，12℃及 17℃貯藏者則緩和下降，蒸散率在 3 個溫度處理之變化都很和緩，顯示鮮重之減少可能是吸水降低所影響。在 7℃貯藏後佛燄苞、肉穗花序與花莖之呼吸率在一直維持最高；12℃貯藏者佛燄苞呼吸率比 17℃貯藏者高但差異不顯著，肉穗花序與花莖之呼吸率則比 17℃貯藏者高，顯示 7℃與 12℃貯藏都使切花受傷害。7℃貯藏後，佛燄苞、肉穗花序與花莖都有顯著之乙烯生成，移到常溫後，肉穗花序與花莖之乙烯生成降到極低，佛燄苞則一直維持較高之乙烯生成，說明佛燄苞可能受傷較嚴重。12℃貯藏佛燄苞之反應也有相似之現象，但比 7℃貯藏輕微。這些資料顯示在寒害反應上，呼吸率之變化比品質劣化與吸水率之變化較快也較明確。

**關鍵詞**：切花品質、吸水率、蒸散率、呼吸率、乙烯生成。

## 前言

火鶴花係台灣重要外銷切花之一，以空運外銷日本為主。由於空運費甚高，以及大量出口時有售價降低之現象，因此海運有其需求性。火鶴花屬於熱帶花卉，低溫貯運會產生寒害，降低貯運後瓶插品質與壽命，影響海運出口之發展。雖然行政院農業委員會台南區農業改良場有推廣火鶴花切花外銷之保鮮處理方法 (Wang *et al.* 2005)，空運效果甚佳，海運則仍未普及。

火鶴花切花以海運輸日需貯運 7–10 d，此長時間貯運之適當溫度在美國農部資料曾報導為 13℃ (Hardenburg *et al.* 1986)。Paull (1987) 以多個品種試驗，發現長時間貯運之適合溫度為 12.5–20℃，低於 10℃將會產生寒害，主要之寒害徵狀為佛燄苞褐化或藍化 (blueing)。火鶴花老化有許多徵狀，主要為佛燄苞褐化或藍化，而肉穗花序褐化與壞疽及佛燄苞失去光澤等現象和寒害徵狀相似 (Paull 1982)。減緩火鶴花老化之方法，早期之研究於採收後以硝酸銀水溶液短時間浸插切口，或是佛燄苞以臘處理 (Paull & Goo 1982)，近期之研究則以 BA (benzyladenine) 浸或噴佛燄苞，可以顯著的提高貯運後之瓶插壽命 (Paull & Chantrachit 2001)。

台灣火鶴花切花近年有部分以海運外銷日本，推薦之海運貨櫃溫度為 15℃，‘丘比特’ 火鶴花切花在 12℃以下海運會產生寒害，運輸溫度提高則容易失水而降低品質 (Wang *et*

投稿日期：2012 年 9 月 6 日；接受日期：2013 年 4 月 15 日。
* 通訊作者：cchuang@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所作物組研究助理。台灣 台中市。

*al.* 2005)。本研究以火鶴花主要之外銷品種 '丘比特' 爲材料，經低溫貯運後，在瓶插品質劣化之過程中測量一些生理變化，包括吸水率、呼吸率等，以瞭解寒害對其生理之影響，作爲改善低溫貯運技術研究之參考。

## 材料與方法

'丘比特' 火鶴花切花於 2008 年取自后里專業生產農戶，栽種於一般網室，外覆遮光度 70–80% 之黑色遮光網，於夏季再加一層遮光度 50% 之內網，植株栽培於地上床畦，主要栽培介質爲椰殼。試驗用切花選取類似外銷之規格，長度約 60 cm，熟度爲肉穗花序 2/3 轉色 (上黃下白)，於切口外套保鮮管，以外銷包裝方式裝箱，每箱裝 12–15 支切花，在 7℃、12℃、17℃ 下黑暗貯藏 7 d。其中，7℃ 貯藏預期會產生嚴重寒害，以 12℃ 貯藏是預期會產生輕度寒害，以 17℃ 貯藏則預期不會導致寒害，作爲對照組。本研究未以 15℃ 貯藏，因爲預備試驗顯示以 15℃ 貯藏，偶會會發生寒害，因此未採用。各貯藏溫度使用 30 支切花，使用於品質調查、吸水鮮重、呼吸率及乙烯生成等測定 (各量測 4 次)，分爲 6 批材料，每批使用 5 支 (5 重覆)。

### 切花品質調查

切花於低溫貯藏結束後，打開紙箱，調查切花開箱品質，之後切花繼續放在紙箱內，移到常溫 (20℃)，放置 1 d 後調查拍賣品質。之後將切花單支瓶插於 100 mL 量筒中，內裝去離子水 50 mL，置於 20℃ 室內，每日光照 10 h，以日光燈 (長 120 cm，FL40D/38，旭光牌，台灣) 作爲光源，在花朵上方處之光照強度約 16 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$，每日上午 8 時至下午 6 時照明。分別於瓶插 3 d (貯藏後 4 d) 及瓶插 5 d (貯藏後 6 d) 後，調查瓶插品質。

品質調查以佛燄苞及肉穗花序之劣化爲主，佛燄苞原始品質爲鮮豔之紅色，劣化時轉爲帶有淡紫色及褐色之色澤。以人爲觀察予以評分，相似於剛採收時色澤者爲 10 分，依變色面積，評分漸降，最低爲 1 分 (變色面積 0%：10 分，1–20%：7 分，21–40%：5 分，41–60%：3 分，> 61%：1 分)。肉穗花序之劣化由頂端往下褐化，評分由 10 分漸降 (變色長度 0%：10 分，1–20%：7 分，21–40%：5 分，41–60%：3 分，> 61%：1 分)，花莖劣化時色澤轉爲淡黃褐色 (變色程度深綠：10 分，淺綠帶微黃：7 分，淡黃：5 分，深黃：3 分，褐化：1 分)。

### 吸水率、鮮重變化及蒸散率之測定

進行吸水率等測定之切花，於開箱取出後，將切口處之花莖切去約 3 cm，逐支瓶插於 100 mL 量筒，量筒內裝 50 mL 之去離子水，量筒口以石腊膜封住，每間隔 1 d 測量切花吸水量及鮮重等變化。

吸水率、鮮重變化與蒸散率之測定與計算如下：

吸水率 (mg $H_2O$ $g^{-1}$ FW $d^{-1}$) = (前次瓶插量筒內之水重 – 測定當日瓶插量筒內之水重)/原始切花鮮重/日數

鮮重變化百分率 (%) = (當日切花鮮重 – 前次切花鮮重)/原始切花鮮重/日數 × 100%

蒸散率 (%) = [ 前次 (切花鮮重 + 瓶插管內水重) – 當次 (切花鮮重 + 瓶插管內水重)]/原始切花鮮重/日數 × 100%

### 切花不同部位之呼吸率與乙烯生成之測定

本項測定使用之切花，於貯藏後同樣瓶插於去離子水中，於開箱、移到常溫 1 d、4 d 及 6 d，各取 5 支切花，進行呼吸率及乙烯生成之測定。

測定時將切花之佛燄苞、肉穗花序、花莖等切離稱重後密封，佛燄苞片以特百惠密封罐 (直徑約 19 cm，高度約 6 cm，體積約 1,200 mL) 密封，肉穗花序、花莖 (切成 3 段，每段約 15 cm) 各置於 50 mL 量筒，量筒體積每支先經確定，量筒管口先以牙醫用之橡膠片封包，外部再以特製不透氣之複層塑膠布 (依需求製作，三櫻企業股份有限公司，台灣) 封包，以橡皮筋捆綁密封，於密封 1 h 後測呼吸率與乙烯之生成量。

呼吸率之測定方法爲密封 1 h 後，以注射針筒抽 1 mL 氣體打入氣相層析儀 (Shimadzu, Model 8 AIT，日本) 測定二氧化碳濃度，再換算爲呼吸率 ($\mu L^{-1}$ $g^{-1}$ $h^{-1}$)。此氣相層析儀以熱傳導係數檢測器 (thermo conductivity detector; TCD) 檢測，注入口及檢測器溫度設爲 90℃，層析管溫度設爲 50℃，其內填充 Porapak Q 80–100 mesh (Alltech，美國)。

乙烯生成之測定，氣體之取樣和呼吸率測定法相似，乙烯濃度以氣相層析儀 (Model GC 8 AIF，Shimadzu，日本) 分析，以火燄離子化檢測器 (flame ionization detector; FID) 檢測，注入口與感應器溫度設爲 150℃，層析管溫度設爲 80℃，其內填充 Porapak Q 80–100 mesh。

### 數據統計分析

本試驗結果數據以 SAS 軟體進行變方分析及最小顯著差異分析 (least significant difference; LSD) ($P$ < 0.05)，圖表繪製則使用 Sigma Plot®。

## 結果

### 低溫貯藏對切花瓶插品質之影響

‘丘比特’ 火鶴花切花經過 7℃、12℃、17℃等不同溫度貯藏後，佛燄苞之品質以 7℃貯藏者在冷藏結束，開箱時就已較 12℃與 17℃貯藏者差 (圖 1A)，佛燄苞已褪色，色澤轉暗。經移到 20℃ 1 d 後，色澤轉暗的程度更爲嚴重，且隨著瓶插時間愈久褐化程度愈加深，色澤轉爲紫及褐色。以 12℃和 17℃貯藏者差異不大，於瓶插過程，品質下降幅度較緩慢 (圖 1A)。貯藏後 6 d，12℃貯藏者品質開始下降，惟與 17℃貯藏者無顯著差異。

肉穗花序品質之變化情況類似於佛燄苞，7℃貯藏者，肉穗花序劣化迅速 (圖 1B)。肉穗花序之劣化由頂端開始轉黑，逐漸往基部延伸。於貯後 1 d，肉穗花序之末端已有少量轉黑，貯後 6 d，有一半以上都已褐化。17℃貯藏者，只有少量褐化，且瓶插過程劣化速度

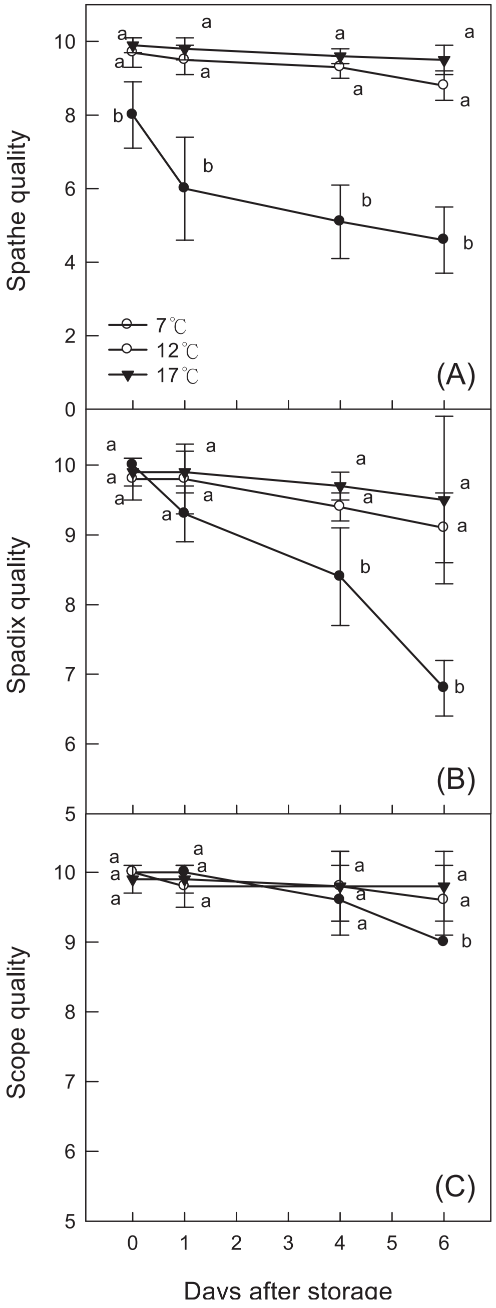


**圖 1.** ‘丘比特’ 火鶴花切花經 7℃、12℃與 17℃貯藏7日，移到20℃後 (A) 佛燄苞、(B) 肉穗花序及 (C) 花莖之品質變化。

**Fig. 1.** Changes of (A) Spathe, (B) Spadix, and (C) Scope quality of ‘Tropical’ anthurium cut flower at 20℃ after storage at 7℃ , 12℃ and 17℃ for 7 days. The bars indicate the standard deviation (sd). Means followed by the same letter within each day are not significantly different by least significant difference (LSD) test at $P$ < 0.05.

緩慢。12℃貯藏者，於瓶插時，肉穗花序品質劣化較 17℃貯藏者快，但差異不顯著。

花莖在 3 個溫度貯藏後及瓶插時，品質劣化程度不大 (圖 1C)，只有以 7℃貯藏者，於貯後 6 d，花莖之綠色略有淡化。

## 低溫貯藏對切花吸水率、鮮重與蒸散率之影響

‘丘比特’ 火鶴花切花經貯藏後，瓶插時吸水率逐漸下降 (圖 2A)，以 7℃貯藏者，下降幅度最大，12℃及 17℃貯藏者下降速度比 7℃和緩，其中 12℃貯藏者較 17℃貯藏者略快，但兩者差異不顯著。

鮮重變化趨勢和吸水率之變化趨勢相似，以 7℃貯藏者，在瓶插期間鮮重快速下降 (圖 2B)，而以 12℃及 17℃貯藏者，下降速度和緩，兩者之間無顯著差異。

蒸散率在 3 個溫度貯藏後之變化都很和緩，在調查期間只些微下降。12℃貯藏者之蒸散率較 17℃與 7℃貯藏者略高，但差異顯著 (圖 2C)。

## 低溫貯藏對切花不同部位呼吸率之影響

‘丘比特’ 火鶴花切花經 7℃貯藏後，以及移到 20℃與瓶插 6 d 期間，其佛燄苞、肉穗花序與花莖之呼吸率皆顯著高於 12℃與 17℃貯藏者 (圖 3)；12℃貯藏者，肉穗花序與花莖之呼吸率也較 17℃貯藏者高。12℃貯藏者，其佛燄苞之呼吸率較 17℃貯藏略高，惟差異不顯著。結果顯示，‘丘比特’ 火鶴花切花在 7℃與 12℃貯藏 7 d，佛燄苞、肉穗花序與花莖三個部位同時皆受到生理傷害，促使呼吸率提高。而在 7℃貯藏者，其呼吸率大多高於 12℃貯藏者，說明 7℃貯藏對切花之傷害大於 12℃貯藏者。

## 低溫貯藏對切花不同部位乙烯生成之影響

‘丘比特’ 火鶴花切花在 7℃貯藏結束時 (貯後 0 d)，其佛燄苞、肉穗花序與花莖之乙烯生成皆顯著高於 12℃與 17℃貯藏者 (圖 4)。切花移至常溫 20℃與瓶插期間，7℃貯藏者佛燄苞之乙烯生成維持高於 17℃貯藏者 (圖 4A)。

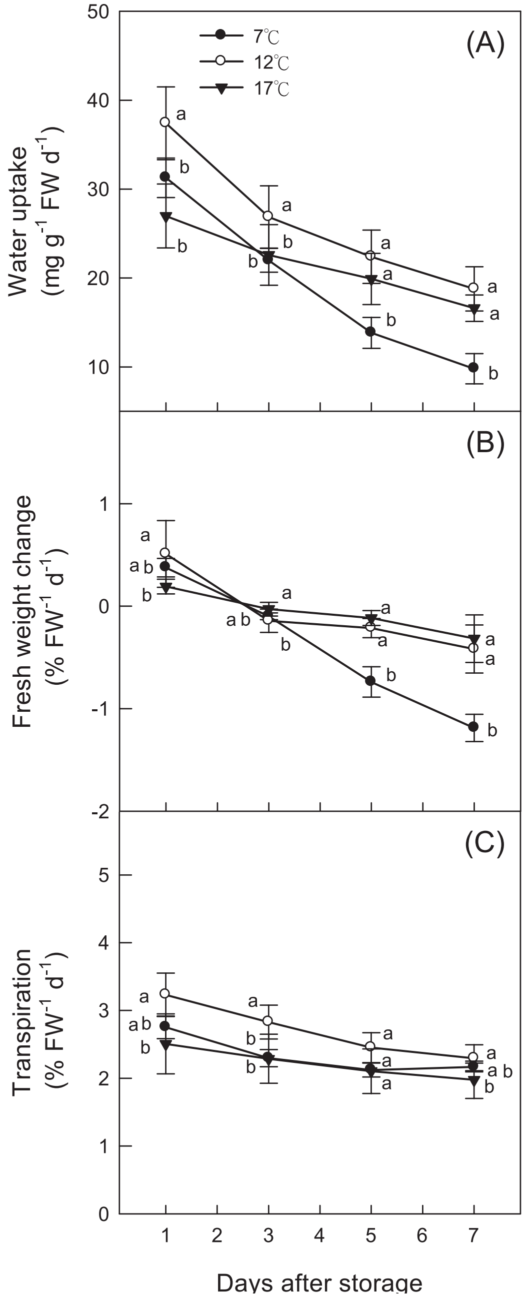


**圖 2.** ‘丘比特’ 火鶴花切花經 7℃、12℃與 17℃貯藏 7 日，移到 20℃後之 (A) 吸水率、(B) 鮮重與 (C) 蒸散率之變化。

**Fig. 2.** Changes of (A) water uptake rate, (B) fresh weight change rate, and (C) transpiration rate of `Tropical' anthurium cut flower at 20℃ after storage at 7℃, 12℃ and 17℃ for 7 days. The bars indicate the standard deviation (sd). Means followed by the same letter within each day are not significantly different by least significant difference (LSD) test at $P < 0.05$.

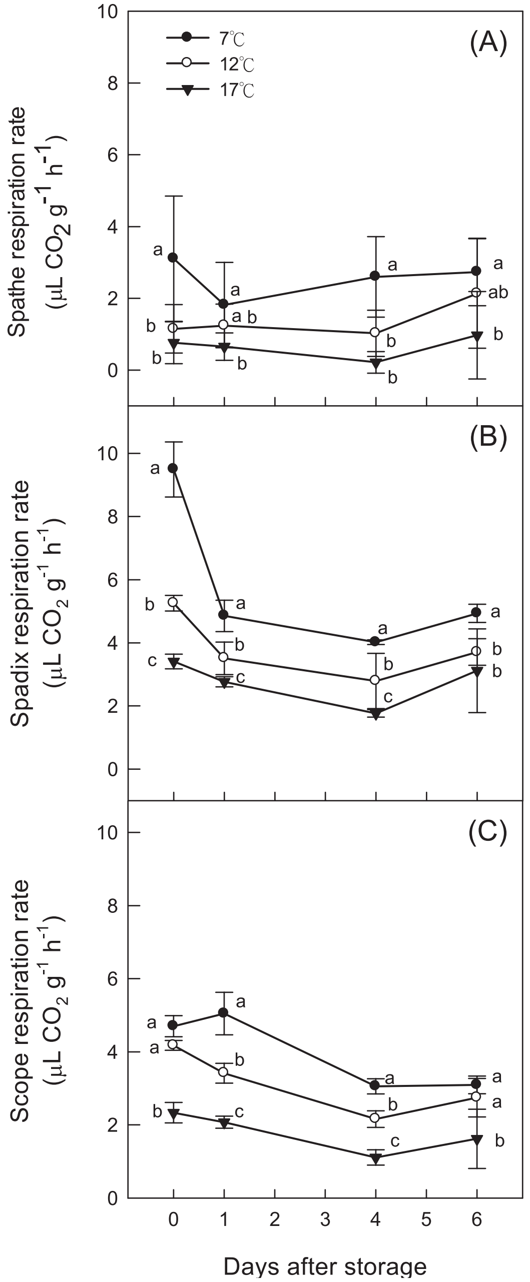


**圖 3.** ‘丘比特’ 火鶴花切花經 7℃、12℃與 17℃貯藏7日，移到20℃後(A) 佛燄苞、(B) 肉穗花序及 (C) 花莖呼吸率之變化。

**Fig. 3.** Changes of respiration rate in (A) Spathe, (B) Spadix, and (C) Scope of ‘Tropical’ anthurium cut flower at 20℃ after storage at 7℃ , 12℃ and 17℃ for 7 days. The bars indicate the standard deviation (sd). Means followed by the same letter within each day are not significantly different by least significant difference (LSD) test at $P < 0.05$.

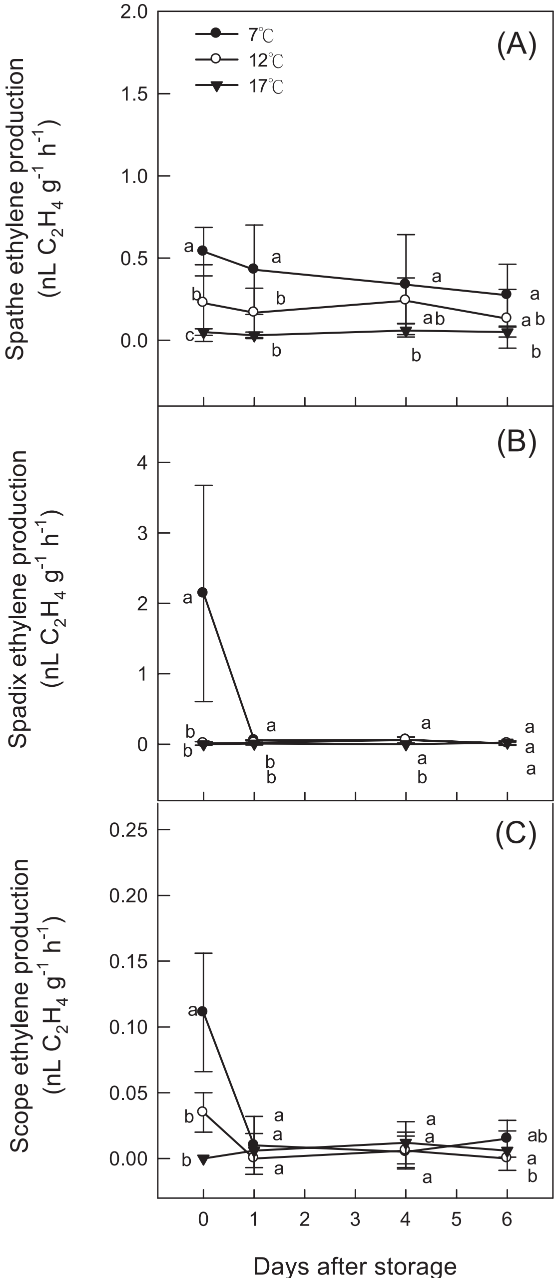


**圖 4.** ‘丘比特’ 火鶴花切花經 7℃、12℃與 17℃貯藏7日，移到20℃後(A) 佛燄苞、(B) 肉穗花序及 (C) 花莖乙烯生成之變化。

**Fig. 4.** Changes of ethylene production rate in (A) Spathe, (B) Spadix, and (C) Scope of ‘Tropical’ anthurium cut flower at 20℃ after storage at 7℃ , 12℃ and 17 ℃ for 7 days. The bars indicate the standard deviation (sd). Means followed by the same letter within each day are not significantly different by least significant difference (LSD) test at $P < 0.05$.

肉穗花序與花莖除了在 7℃貯藏剛結束時有乙烯生成之外，於切花移到常溫與在常溫瓶插後，乙烯生成即降至低限 (圖 4B、圖 4C)，結果近似於 12℃與 17℃貯藏者。12℃貯藏者，其佛燄苞亦有少量乙烯生成，高於 17℃貯藏者 (圖 4A)；於移溫 1 d 之後，和 17℃貯藏者相似。肉穗花序與花莖乙烯生成皆極低，與 17℃貯藏者無顯著差異。

## 討論

本研究中 '丘比特' 火鶴花切花於 7℃貯藏結束時，佛燄苞之品質已呈現劣化 (圖 1A)，其色澤由鮮紅轉爲帶紫及褐色，此徵狀可類似於 Paull (1987) 所述之寒害徵狀。這些切花在移至常溫瓶插時，佛燄苞品質快速劣化。肉穗花序於冷藏結束時，品質劣化不明顯，於移溫後才迅速劣化。花莖則到了貯後 6 d 才顯現異常品質，說明 7℃貯藏對佛燄苞之傷害反應最快或最強，對肉穗花序次之，對花莖的傷害最小或反應最慢。

以 12℃與 17℃貯藏者相較，12℃貯藏者佛燄苞與肉穗花序品質比 17℃貯藏者有較快劣化之趨勢，但是二者無顯著之差異。'丘比特' 火鶴花切花貯運溫度一般認爲接近 15℃ (Wang *et al.* 2005)，以 12℃貯藏可能會加速瓶插期間品質之劣化。然而，本研究以 12℃貯藏對品質劣化之影響不如預期的大，可能係因貯藏時間僅 7 d，貯藏時間較短，而且調查日數亦僅 6 d，調查時間較短之故。

經 7℃貯藏後，瓶插期間吸水率下降很快，其鮮重下降幅度也很大，而蒸散率下降則較小，顯示 7℃貯藏者，鮮重下降可能肇因於吸水率減少。其原因是否因爲花莖受 7℃貯藏受損，以致降低其吸水或輸水能力，或是佛燄苞或肉穗花序因 7℃貯藏受損，降低其活力，導致花莖吸水能力降低，其原因有待繼續探討。

以 12℃或 17℃貯藏後，瓶插期間其吸水率與鮮重之變化都較 7℃貯藏者和緩，顯示以此兩溫度貯藏對 '丘比特' 火鶴花切花水分吸收與鮮重之影響遠低於 7℃貯藏者。12℃貯藏者，瓶插 3 d 期間吸水率之下降比 17℃貯藏者略快，其鮮重變化和 17℃貯藏者無顯著差異，顯示 12℃貯藏對 ' 丘比特 ' 火鶴花切花吸水仍有輕微影響。

經 7℃貯藏後，其佛燄苞與肉穗花序品質提早劣化，吸水率和鮮重下降之幅度甚大，顯示吸水率與鮮重之喪失和品質之劣化反應相互對應。12℃貯藏者吸水率下降大於 17℃貯藏者，但品質之劣化和 17℃貯藏者無差異；類似的情況，以 17℃貯藏者在瓶插過程中，吸水率輕微下降，在品質上則未顯著劣化，顯示貯藏傷害在吸水率之變化較品質之變化更爲靈敏或更快顯現。

以 7℃貯藏將使佛燄苞、肉穗花序與花莖在冷藏結束時 (貯後 0 d)，呼吸率高於 17℃貯藏者，顯示切花在尚未移溫於 20℃時，此 3 個部位都已經產生傷害。惟此時在品質上只有佛燄苞可目視劣化現象，肉穗花序及花莖皆尚無明顯外觀徵狀，說明 '丘比特' 火鶴花切花在低溫貯藏產生寒害之反應中，呼吸率之變化較品質之變化快且明確。以 12℃貯藏而言，切花貯藏後品質和 17℃貯藏者相似，吸水率與鮮重等之變化亦相近，而其肉穗花序呼吸率在貯藏結束時及移溫與瓶插期間都高於 17℃，顯示測量呼吸率在偵測寒害是比較敏感之方法，而且可以得知寒害所產生之傷害在貯藏結束前 (出庫時) 即已存在，在貯藏後 (拍賣時) 及瓶插時也一直存在，而且對佛燄苞、肉穗花序及花莖都有產生影響。

植物體於遭受低溫產生寒害時，呼吸率提高是寒害的一項明顯徵狀，而且很早就會表現出來 (Wang 1982)，呼吸率提高表示植物組織內之生理代謝受到干擾，需要加速代謝以去除異常產生之物質。如果寒害程度不高，當植物體移至常溫一段時間後，呼吸率會下降，再恢復正常。本試驗 '丘比特' 火鶴花切花以 7℃及 12℃貯藏 7 d 後，肉穗花序與花莖呼吸率於移溫後一直沒有下降至近似於 17℃貯藏者，顯示 12℃貯藏和 7℃貯藏，都使切花產生明確的寒害，而且一直沒有恢復。

乙烯生成也是植物體產生寒害後的生理反應之一 (Wang 1982)，火鶴花切花不是更年性花卉，正常下不會產生乙烯。有許多非更年性的植物體如胡瓜，在寒害後也會產生乙烯 (Wang & Adams 1982)。本研究發現 7℃ 貯藏會使佛燄苞、肉穗花序及花莖在貯藏結束時產生乙烯，證實寒害也會使火鶴花切花產生乙烯。肉穗花序與花莖之乙烯生成，在移至常溫後即消失，可能是因為寒害導致乙烯生成，恢復正常後即停止產生乙烯。而佛燄苞之乙烯生成一直維持較高濃度，說明佛燄苞可能係受到寒害較嚴重之部位，其影響在切花移至常溫後仍無法復原。12℃ 貯藏只有在佛燄苞於貯藏結束時產生乙烯，雖然在瓶插期間其乙烯生成低於 7℃ 貯藏者，為與 17℃ 貯藏者差異不顯著。肉穗花序與花莖之乙烯生成則很低，顯示 12℃ 貯藏對佛燄苞有輕微促進乙烯生成之作用，然此效應甚低。

綜合本研究結果顯示，'丘比特' 火鶴花切花以 7℃ 貯藏 7 d 對品質將會產生嚴重劣化之作用，並反映於吸水率、呼吸率與乙烯生成等生理現象。以 12℃貯藏 7 d，在品質上於瓶插 6 d 期間，尚未產生明顯不利之影響，此可能與貯藏日數較短或是瓶插時間不長有關；但在貯藏後及移溫時，吸水率下降幅度較大，肉穗花序與花莖之呼吸率較高及貯藏後佛燄苞乙烯生成較高等結果，顯示 12℃ 貯藏在生理上確實有造成部分影響。此亦說明生理反應比品質反應更明確，以 12℃ 貯運有較高的風險。以 17℃貯藏 7 d 似乎未對 '丘比特' 火鶴花切花品質產生不利影響，在移溫及瓶插時之吸水率、呼吸率與乙烯生成等生理反應都維持平穩，無異常發生。目前以 15℃ 海運日本仍有品質劣化之反應，以 17℃ 貯運或許是較適合之溫度。

## 引用文獻


Hardenburg, R. E., A. E. Watada, and C. Y. Wang. 1986. Storage and handling details for certain flowers. p. 88. *in*: The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks (Gross, K. C., C. Y. Wang, and M. Saltveit, eds.) USDA Agric. Handbook. No. 66. Washington DC. 130 pp.

Paull, R. E. 1982. Anthurium (*Anthurium andraeanum* Andr'e) vase life evaluation criteria. HortScience 17:606–607.

Paull, R. E. 1987. Effect of storage duration and temperature on cut anthurium flowers. HortScience 22:459–460.

Paull, R. E. and T. T. C.Goo. 1982. Pulse treatment with silver nitrate extends vase life of anthuriums. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107:842–844.

Paull, R. E. and T. Chantrachit. 2001. Benzyladenine and the vase life of tropical ornamentals. Postharvest Biol. Technol. 21:303–310.

Wang, C. Y. 1982. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. HortScience 17:173–186.

Wang, C. Y. and D. O. Adams. 1982. Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus* L.). Plant Physiol. 69:424–427.

Wang, Y. C., D. L. Lin, S. S. Wang., Y. T. Chang, and C. S. Chang. 2005. The application of postharvest technology on marine shipment of *Anthurium* cut flower for export. p.184–190. *in*: Proceedings of Symposium on Research and Application of Postharvest Technology of Horticultural Crops. October 1, 2005. Taichung. Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 117, Taichung. (in Chinese with English abstract)

# Studies on Physiological Responses of Anthurium Cut Flowers after Cold Storage

Chao-Chia Huang[1,*], Huey-Suey Huang[2], and Chin-Yu Tsai[2]

## Abstract

Huang, C. C., H. S. Huang, and C. Y. Tsai. 2012. Studies on the physiological responses of anthurium cut flowers after cold storage. J. Taiwan Agric. Res. 62(2):157–164.

The quality and physiological responses of anthurium (*Anthurium andraeanum* L. 'Tropical') cut flowers were investigated after dark storage at 7℃, 12℃, and 17℃ for 7 days. As the results indicated, spathe turned brown at the end of storage at 7℃, and both spathe and spadix turned dark brown quickly when the cut flowers were moved to 20℃ after storage while stem did not change until 6 days after storage. The browning of spathe and spadix of flowers stored at 12℃ occurred after 6 days in storage. These three parts remained no change when stored at 17℃. The rates of water uptake and fresh weight change in flowers stored at 7℃ declined dramatically during vase period. The declining rates were much less in flowers stored at 12℃ and 17℃. The transpiration rate of flowers decreased slowly in all treatments. The respiration rates of spathe, spadix and floral stem at the end of the storage and during the vase period were the highest in flowers stored at 7℃ than those stored at 12℃ and 17℃. The respiration rates of spadix and floral stem of flowers stored at 12℃ were also higher than those stored at 17℃, suggesting that flowers were injured during the storage at 7℃ and 12℃. The ethylene production rate increased in spathe, spadix and floral stem at the end of storage at 7℃. The rate decreased in spadix and floral stem when moved to 20℃ while it remained high in spathe. The ethylene production rate was a little higher in spathe of flowers stored at 12℃ than that stored at 17℃ at the end of storage. These data suggest that respiration rise is more sensitive to low temperature than the responses of flower quality and water uptake and hence, is considered a good indicator of chilling injury for anthurium.

**Key words:** Flower quality, Water uptake rate, Transpiration rate, Respiration rate, Ethylene production rate.

Received: September 6, 2012; Accepted: April 15, 2013.

* Corresponding author, e-mail: cchuang@tari.gov.tw

1 Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

2 Research Assistants, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(2):165–173 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06202.06

# 網室甜椒害蟲與害蟎種類之調查及防治藥物之篩選

郝秀花 [1,*]

## 摘要

郝秀花。2012。網室甜椒害蟲與害蟎種類之調查及防治藥物之篩選。台灣農業研究 62(2):165–173。

網室栽培甜椒可以阻隔大型的害蟲侵入，但對小型害蟲的發生因無雨水沖刷而較為嚴重，調查發現蚜蟲類、薊馬類、粉介殼蟲類、神澤氏葉蟎及茶細蟎，無論在網室或田間皆有發生，唯在網室內發生較嚴重，而螺旋粉蝨、番茄斑潛蠅及夜蛾類則僅在田間有發生。利用五種非農藥物質防治茶細蟎試驗，結果以窄域油、葵花油加無患子及木醋液加無患子的防治效果較好，防治率分別為 59.7%、49.4% 及 48.7%。以五種非農藥物質防治神澤氏葉蟎試驗，結果除了無患子的防治效果較差外，其他四種處理 (硫磺粉、窄域油、葵花油 + 無患子及苦楝油) 之防治率皆可達 80% 以上。以四種殺蟎劑防治茶細蟎及神澤氏葉蟎試驗，結果以 1% 密滅汀乳劑 1,500 倍防治細蟎效果最好，防治率為 89.3%，2% 阿巴汀乳劑 2,000 倍次之，防治率為 86.9%；以 10% 依殺蟎水懸劑 4,000 倍防治神澤氏葉蟎效果最好，防治率為 98.5%，1% 密滅汀乳劑 1,500 倍次之，防治率為 98.4%。以五種混合非農藥物質處理防治南黃薊馬試驗，結果以木醋液加窄域油防治效果最好，防治率為 76.4%，木醋液加葵花油次之，防治率為 72.8%。防治絲粉介殼蟲的試驗結果，以 20% 達特南 SG 3,000 倍及 9.65% 賜派滅 SC 3,000 倍防治效果較佳，防治率達 77% 以上，而非農藥物質中以矽藻土 500 倍防治介殼蟲的效果最好，防治率為 71.6%。

**關鍵詞**：甜椒、害蟲、防治、非農藥物質、農藥。

## 前言

甜椒屬茄科番椒屬，學名爲 *Capsicum annuum* L.，爲一年或多年生作物，原產於南美洲秘魯及中美洲墨西哥一帶。依據行政院農業委員會 2013 年出版的《台灣農業統計年報》，在 2011 年台灣番椒栽培面積達 2,087 ha，年產量 21,611 Mg。甜椒主要栽培產區在嘉義縣、南投縣、屏東縣、雲林縣、高雄市、台南市及花蓮縣等地，春作中南部播種適期在 1 至 3 月，秋作在 8 至 10 月，但因品種多元化及栽培改進，甜椒周年均有生產。

因爲可酌予控制非生物性環境條件，網室中栽植之甜椒可獲致較佳產量與品質，惟其仍有相當種類病蟲害發生，其中以歸屬於小型害蟲之危害較爲嚴重。一般的甜椒栽培過程，對於害蟲防治係以化學藥劑爲主，考量設施栽培之甜椒多爲連續採收型作物，爲減少農藥殘留實不宜長期使用化學藥劑控制。因此，尋求安全的防治方法，乃健康安全農作生產勢在必行的先期作業。

非農藥資材並非是施用後能立即見效的防治方式，僅爲在栽培過程中，既能減少農藥使用又可防治害蟲的方法之一 (Wang 2010)。非農藥除蟲物質中的油類應用在害蟲防治的原理，Hewlett (1975) 認爲精製礦物油可阻塞害蟲的氣管，造成缺氧而死亡；Schoonhoven (1978) 認爲有部份的油類是干擾正常的呼吸，造成害蟲窒息死去。目前國內、外也已普遍利

投稿日期：2013 年 1 月 16 日；接受日期：2013 年 4 月 18 日。
* 通訊作者：hao@fthes-tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 高雄市。

用油類於農作物害蟲的防治上，如防治蚜蟲 (Butler *et al.* 1991; Yu 2009)、綠豆象 (Babu *et al.* 1989) 及害蟎 (Herron *et al.* 1998; Nicetic *et al.* 2001; Pertot *et al.* 2008; Yu & Chen 2009)。

本研究主要在於調查網室甜椒之主要蟲害種類，以瞭解不同栽培環境下主要害蟲與害蟎的種類及發生，並針對主要害蟲、害蟎作適時防治。另因甜椒採收期長達 6 個月，亦測試非農藥物質對主要害蟲的防治效果，期能在採收時期利用非農藥物質來取代部分化學農藥的使用，降低農藥的施用次數與用量並減少殘留，達到降低生產成本及提高農民收益之目標。

## 材料與方法

### 甜椒害蟲與害蟎種類調查

甜椒害蟲與害蟎種類調查自 2009 年 9 月至 2011 年 6 月止，在高雄市鳳山區農委會農業試驗所之鳳山熱帶農業試驗分所試驗田進行。因秋作自 9 月起到隔年 6 月，採收時間達 6 個月，相對長於一般春作只可採收 3 個月，因此本試驗以秋作為主。甜椒種子為購自農友種苗公司之 ‘麗妃星’ (黃椒) 品種，於 9 月在網室中育苗，並自苗期即開始調查害蟲與害蟎種類。至 10 月幼苗長至 4 片時，分別移至網室 [長 (L) × 寬 (W) × 高 (H) = 8 m × 20 m × 4 m；網目為 32 目網] 內及田間 (L × W = 8 m × 20 m) 定植。二試驗區各種植 8 畦，每畦 60 株，二區各 480 株，分別供田間及網室內害蟲與害蟎種類調查用。

### 茶細蟎非農藥防治試驗

2009 年 9 月至 10 月在高雄市鳳山區本分所網室內進行，以甜椒盆苗 (約有 4 片葉) 為供試植物，供試物質有木醋液 (光益農化工廠有限公司)、窄域油 (99%，玉田地公司)、葵花油 (100%，統一公司)、無患子 (43.2% 皂素，無患子生技公司) 及矽藻粉 (農友公司)，其中木醋液、葵花油、矽藻粉及無患子皆以 9：1 配置成供試混合物質，加上無患子及對照無施藥共 6 種處理，每處理皆配置成 500 倍稀釋液噴施。試驗設計採逢機完全區集設計，每小區 20 株，每處理 4 重覆，共 480 株，每處理每隔 7 日噴藥 1 次，連續 2 次。每次噴藥前及第二次噴藥後 7 日進行茶細蟎調查，共調查 3 次，每次每小區逢機採 20 株以心葉鏡檢 (調) 查葉片上之活蟎 (幼蟎及成蟎) 數，再以 Henderson & Tilton’s 公式計算防治率 (%) (Henderson & Tilton 1955)。

$$\text{防治率} = (1 - \frac{\text{處理區施藥後害蟎數} \times \text{對照區處理前害蟎數}}{\text{處理區施藥前害蟎數} \times \text{對照區處理後害蟎數}}) \times 100\%$$

### 神澤氏葉蟎非農藥防治試驗

2010 年 1 月至 2 月在本分所網室內進行，供試甜椒為定植後 3 個月的植株，供試非農藥物質為 80% 硫磺粉 (德城行有限公司)、窄域油 (99%，玉田地公司)、葵花油 (100%，統一公司)、苦楝油 (含 70% 苦楝油精，農友公司) 及無患子 (43.2% 皂素，無患子生技公司) 等 5 種，其中葵花油與無患子以 9：1 配置成供試混合物質。每處理皆配置成 500 倍試液噴施，與無施藥對照共 6 種處理。試驗設計採逢機完全區集設計，每小區 20 株，每處理 4 重覆，共 480 株，每處理每隔 7 日噴藥 1 次，連續噴 2 次。第一次處理前及每次處理後 7 日後調查神澤氏葉蟎 1 次，共調查 3 次，每小區逢機調查 20 葉片，計算其上之蟎數 (幼若蟎及成蟎)，並依上述公式計算防治率 (%)。

### 篩選殺蟎劑防治茶細蟎及神澤氏葉蟎試驗

2011 年 1 月至 2 月在本分所網室內進行，供試甜椒為定植後 3 個月的植株，在政府推行延伸使用藥劑前，植保手冊中防治甜椒害蟎的殺蟎劑僅 1 種。選用植保手冊中已推廣於蔬菜上的殺蟎劑，包括 25% 新殺蟎乳劑 (台灣先正達公司，稀釋 500 倍)、1% 密滅汀乳劑 (日商三共公司，稀釋 1,500 倍)、10% 依殺蟎水懸劑 (住友公司，稀釋 4,000 倍)、2% 阿巴汀乳劑 (台灣先正達公司，稀釋 2,000 倍) 等，與無施藥對照共 5 處理。測試其對甜椒

茶細蟎及神澤氏葉蟎的防治效果。試驗設計採逢機完全區集設計，每小區 20 株，每處理 4 重覆，共 400 株。各藥劑每隔 7 日噴 1 次，連續噴 2 次，於第一次噴藥前及每次噴藥後 7 日後調查 1 次，共調查 3 次。其中，茶細蟎採心葉調查，神澤氏葉蟎則採中老葉調查，每小區逢機調查20葉片，計算葉片上之蟎數，並依上述公式計算防治率 (%)。

### 南黃薊馬防治試驗

2010 年 4 月至 5 月在本分所網室內進行，供試甜椒爲定植後 5 個月的植株，非農藥物質包括木醋液 (光益農化工廠有限公司)、窄域油 (99%，玉田地公司)、葵花油 (100%，統一公司)、苦楝油 (含 70% 苦楝油精，農友公司)、橘衛兵 (含 5.8% 檸檬油精，農友公司) 與無患子 (43.2% 皂素，無患子生技公司) 等，分別予以不同混合，共有 (1) 木醋液 + 無患子 + 葵花油；(2) 木醋液 + 窄域油；(3) 木醋液 + 無患子 + 苦楝油；(4) 木醋液 + 無患子；(5) 木醋液 + 桔衛兵及 (6) 無處理等 6 個處理進行試驗。各處理配製成 500 倍稀釋液噴施，試驗設計採逢機完全區集設計，每小區 20 株，每處理 4 重覆，共 480 株。各處理每隔 7 日噴 1 次，連續噴 2 次，噴藥前及每次噴施後 7 日各調查 1 次，共調查 3 次。每小區逢機調查 10 葉片，計算其上之蟲數，並依上述公式計算防治率 (%)。

### 防治絲粉介殼蟲試驗

2011 年 3 月至 4 月在本分所網室內進行，供試甜椒爲定植後 4 個月的植株，於網室內進行試驗，供試處理有 (1) 窄域油 (玉田地公司) 500 倍；(2) 矽藻粉 (農友公司) 500 倍；(3) 40% 滅大松 (台灣先正達公司) 800 倍；(4) 20% 達特南 (惠光公司) 3,000 倍；(5) 9.65% 賜派滅 3,000 倍 (拜耳公司)；(6) 24.7% 賽速洛寧 (台灣先正達公司) 2,000 倍及 (7) 不噴藥等 7 個處理。試驗設計採逢機完全區集設計，每小區 20 株，每處理 4 重覆，共 560 株。每 7 日噴藥 1 次，連續噴 2 次，噴藥前及每次噴藥後 7 日各調查 1 次。每小區逢機調查 10 葉片，計算葉片上之蟲數，並依上述公式計算防治率。

## 結果

### 甜椒主要害蟲與害蟎調查

網室內調查甜椒主要害蟲有棉蚜 (*Aphid gossypii* Glover)、桃蚜 [*Myzus persicae* (Sulzer)]、南黃薊馬 (*Thrips palmi* Karny)、花薊馬 [*Thrips hawaiiensis* (Morgan)]、柑桔粉介殼蟲 [*Planococcus citri* (Risso)]、絲粉介殼蟲 [*Ferrisia virgata* (Cockerell)]、茶細蟎 (*Polyphagotarsonemus latus* Banks)、神澤氏葉蟎 (*Tetranychus kanzawai* Kishida) 及番茄銹蜱 [*Aculops lycopersici* (Massee)] 爲害 (表 1)。茶細蟎主要發生在苗期及生育初期，爲害甜椒心葉，致使甜椒心葉皺縮及頂芽無法正常生長；蚜蟲類發生在生育初期至開花結果期，爲害心稍，吸食嫩葉致使心葉皺縮，並排出蜜露誘發煤煙病；薊馬類發生在開花結果期，爲害花器及果實，造成果實畸形及表面出現褐色疤痕；粉介殼蟲類主要爲害整株甜椒，在果實採收期爲害最嚴重，常會在果蒂上聚集爲害，所排出的蜜露會誘發煤煙病，並誘引螞蟻爲害甜椒果實；神澤氏葉蟎在中老葉危害。田間調查結果，除了有上述茶細蟎、薊馬類、粉介殼蟲類、神澤氏葉蟎外，另有螺旋粉蝨 (*Aleurodicus disperses* Russell)、番茄斑潛蠅 [*Liriomyza bryoniae* (Kaltenbach)]、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* Hubner) 及斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura* Fabricius) 等發生爲害。螺旋粉蝨及番茄斑潛蠅主要爲害葉片，夜蛾類幼蟲則食害葉片及潛入果實爲害。

### 非農藥物質防治甜椒茶細蟎試驗

網室中防治試驗以盆苗進行，各種參試物質：木醋液、窄域油、葵花油、矽藻粉及無患子等防治茶細蟎試驗結果，在第一次處理後 7 日以窄域油的防治效果較好，防治率達 62.5%；木醋液及葵花油加無患子防治率分

表 1. 甜椒主要害蟲與害蟎種類。

**Table 1.** A list of major insect and mite pests on sweet pepper.

| Scientific name | Chinese name | Injury site |
|---|---|---|
| *Aphid gossypii* Glover | 棉蚜 | L[z] |
| *Myzus persicae* (Sulzer) | 桃蚜 | L |
| *Thrips palmi* Karny | 南黃薊馬 | L, F |
| *Thrips hawaiiensis* (Morgan) | 花薊馬 | F |
| *Planococcus citri* (Risso) | 柑桔粉介殼蟲 | L, FR |
| *Ferrisia virgata* (Cockerell) | 絲粉介殼蟲 | L, FR |
| *Polyphagotarsonemus latus* Banks | 茶細蟎 | L, FR |
| *Tetranychus kanzawai* Kishida | 神澤氏葉蟎 | L, FR |
| *Aculops lycopersici* (Massee) | 番茄銹蟎 | L, FR |
| *Aleurodicus disperses* Russell | 螺旋粉蝨 | L |
| *Liriomyza bryoniae* (Kaltenbach) | 番茄斑潛蠅 | L |
| *Spodoptera exigua* Hubner | 甜菜夜蛾 | L, FR |
| *Spodoptera litura* Fabricius | 斜紋夜蛾 | L, FR |

[z] L: leaf; F: flower; FR: fruit.

別爲 47.5% 及 45.3%。連續噴完 2 次後的防治效果，也是以窄域油效果最好，防治率爲 56.8%，葵花油及矽藻粉加無患子之防治率分別爲 53.4% 及 53.1% 次之 (表 2)。由此非農藥物質的防治試驗效果之平均值來看，以窄域油的效果較穩定，防治率可達 59.7%。

## 非農藥物質防治神澤氏葉蟎試驗

在田間網室內以 5 種非農藥處理：80% 硫磺粉、窄域油、葵花油、苦楝油與無患子等，測試防治甜椒上神澤氏葉蟎的效果，結果第一次處理後 7 日的防治率以窄域油處理的防治效果最好，防治率爲 85.5%，苦楝油及葵花油加無患子之防治率爲 79.5% 及 78.2% 次之，無患子的防治效果最差，防治率爲 31.3%。處理二次後 7 日調查，結果除了無患子防治率爲 13.5% 外，其餘處理之防治率皆可達 85% 以上 (表 3)。

## 四種殺蟎劑防治茶細蟎及神澤氏葉蟎試驗

在網室內以甜椒盆苗試驗 4 種殺蟎劑 (25% 新殺蟎乳劑 500 倍、1% 密滅汀乳劑 1,500 倍、10% 依殺蟎水懸劑 4,000 倍、2% 阿巴汀乳劑 2,000 倍) 對茶細蟎及神澤氏葉蟎的防治效果。其中，對防治茶細蟎的效果，在第一次施藥後 7 日調查結果，以 1% 密滅汀乳劑 1,000 倍的防治效果最好，防治率爲 80.6%，10% 依殺蟎水懸劑 4,000 倍的防治效果最差，防治率爲 58.4%；第二次施藥後 7 日調查，結果除了依殺蟎防治率爲 61.2% 之外，其餘處理之防治率皆可達 85% 以上 (表 4)。

4 種藥劑防治神澤氏葉蟎試驗，在第一次施藥後 7 日調查，結果以 1% 密滅汀乳劑 1,500 倍、10% 依殺蟎水懸劑 4,000 倍、2% 阿巴汀乳劑 2,000 倍效果最好，防治率有 93% 以上；二次施藥後 7 日調查，這三者的防治率更達 100% (表 5)。

## 非農藥物質不同組合處理防治甜椒南黃薊馬試驗

每種參試物質以未加入木醋液的方式進行防治南黃薊馬試驗，結果效果皆不好。因此，再將每種參試物質加入木醋液，其目的在以木醋液的濃烈味道驅出薊馬，試驗結果：第一次處理後 7 日，木醋液 + 窄域油防治效果最好，防治率達 76.2%，木醋液加葵花油次之，防治率爲 73.6%。第二次處理後 7 日的調查結果，仍以木醋液加窄域油的效果最好，

表 2. 五種非農藥物質防治甜椒茶細蟎的效果。

**Table 2.** Efficacy of five non-pesticide substances for the control of broad mite on sweet pepper.

| Treatment | No. of mites^z (control rate, %) | | | Mean of control control (%) |
|---|---|---|---|---|
| | Before treatment | 7 d after treatment 1st | 7 d after treatment 2nd | |
| Wood vinegar + soapberry (9:1) 500× | 309 ± 10 | 439 ± 8 (47.5) | 511 ± 16 (49.9) | 48.7 |
| Mineral oil 500× | 358 ± 5 | 363 ± 11 (62.5) | 510 ± 11 (56.8) | 59.7 |
| Sunflower oil + soapberry (9:1) 500× | 217 ± 9 | 321 ± 7 (45.3) | 334 ± 6 (53.4) | 49.4 |
| Diatom power + soapberry (9:1) 500× | 302 ±8 | 763 ± 11 (6.6) | 467 ± 14 (53.1) | 29.9 |
| Soapberry 500× | 295 ± 7 | 713 ± 15 (10.6) | 636 ± 14 (34.7) | 22.7 |
| CK | 210 ± 9 | 568 ± 9 | 693 ± 17 (-) | - |

^z Number (mean ± SD) of larvae and adults per twenty leaves.

表 3. 五種非農藥物質防治甜椒神澤氏葉蟎的效果。

**Table 3.** Efficacy of five non-pesticide substances for the control of *Tetranychus kanzawai* on sweet pepper.

| Treatment | No. of mites^z (control rate, %) | | | Mean of control rate (%) |
|---|---|---|---|---|
| | Before treatment | 7 d after treatment 1st | 7 d after treatment 2nd | |
| Sulfur power 500× | 335 ± 12 | 123 ± 8 (78.2) | 99 ± 6 (86.3) | 82.3 |
| Mineral oil 500× | 459 ± 7 | 112 ± 8 (85.5) | 89 ± 8 (91.0) | 88.3 |
| Sunflower oil + soapberry (9:1) 500× | 362 ± 8 | 156 ± 11 (74.4) | 111 ± 10 (85.8) | 80.1 |
| Neem oil 500× | 274 ± 9 | 95 ± 6 (79.5) | 63 ± 3 (89.4) | 84.5 |
| Soapberry 500× | 301 ± 5 | 348 ± 12 (31.3) | 563 ± 15 (13.5) | 22.4 |
| CK | 211 ± 5 | 355 ± 15 (-) | 99 ± 6 (-) | - |

^z Number (mean ± SD) of larvae and adults per twenty leaves.

表 4. 四種殺蟎劑防治甜椒茶細蟎的效果。

**Table 4.** Efficacy of four acaricides for the control of broad mite on sweet pepper.

| Treatment | No. of mites^z (control rate, %) | | | Mean of control rate (%) |
|---|---|---|---|---|
| | Before treatment | 7 d after treatment 1st | 7 d after treatment 2nd | |
| 25% bromopropylate EC 500× | 203 ± 9 | 134 ± 8 (74.0) | 72 ± 3 (85.1) | 79.6 |
| 10% etoxazole SC 4,000× | 156 ± 8 | 165 ± 8 (58.4) | 144 ± 9 (61.2) | 59.8 |
| 1% milbemectin EC 1,500× | 234 ± 10 | 115 ± 6 (80.7) | 12 ± 3 (97.8) | 89.3 |
| 2% abamectin EC 2,000× | 210 ± 9 | 123 ± 8 (76.9) | 16 ± 4 (96.8) | 86.9 |
| CK | 185 ± 9 | 470 ± 12 (-) | 440 ± 16 (-) | - |

^z Number (mean ± SD) of larvae and adults per twenty leaves.

防治率為 76.5%。因此，添加木醋液可以將薊馬驅出，增加處理組合的防治效果 (表 6)。

## 防治甜椒絲粉介殼蟲試驗

同時測試農藥與非農藥物質對甜椒上絲粉介殼蟲的防治效果，藥劑處理部分，第一次施藥後 7 日結果，以 20% 達特南 3,000 倍防治率 73.6% 及 9.65% 賜派滅 3,000 倍防治率 74.1% 較好 (表 7)。第二次處理後 7 日的防治效果，也是以 20% 達特南 3,000 倍及 9.65% 賜派滅 3,000 倍的防治率最好，且增加至 82.0

表 **5.** 四種殺螨劑防治甜椒神澤氏葉螨的效果。

**Table 5.** Efficacy of four acaricides for the control of *Tetranychus kanzawai* on sweet pepper.

| Treatment | No. of mites[z] (control rate, %) | | | Mean of control rate (%) |
|---|---|---|---|---|
| | Before Treatment | 7 d after treatment 1st | 7 d after treatment 2nd | |
| 25%bromopropylate EC 500× | 139 ± 8 | 53 ± 2 (77.4) | 45 ± 3 (85.7) | 81.6 |
| 10%etoxazole SC 4,000× | 113 ± 7 | 6 ± 1 (96.9) | 0 (100.0) | 98.5 |
| 1%milbemectin EC 1,500× | 150 ± 5 | 8 ± 2 (96.8) | 0 (100.0) | 98.4 |
| 2%abamectin EC 2,000× | 126 ± 6 | 14 ± 2 (93.4) | 0 (100.0) | 96.7 |
| CK | 137 ± 7 | 231 ± 12 (-) | 310 ± 8 (-) | - |

[z] Number (mean ± SD) of larvae and adults per twenty leaves.

表 **6.** 非農藥物質防治甜椒南黃薊馬的防治效果。

**Table 6.** Efficacy of non-pesticide substances for the control for southern yellow thrips on sweet pepper.

| Treatment | No. of mites[z] (control rate, %) | | | Mean of control rate (%) |
|---|---|---|---|---|
| | Before treatment | 7 d after treatment 1st | 7 d after treatment 2nd | |
| Wood vinegar + soapberry + sunflower oil (1:1:8) 500× | 149 ± 5 | 39 ± 3 (73.6) | 14 ± 2 (72.0) | 72.8 |
| Wood vinegar + mineral oil (1:9) 500× | 165 ± 8 | 39 ± 4 (76.2) | 13 ± 2 (76.5) | 76.4 |
| Wood vinegar + soapberry + neem oil (1:1:8) 500× | 160 ± 5 | 56 ± 1 (64.7) | 14 ± 3 (73.9) | 69.3 |
| Wood vinegar + soapberry (1:9) 500× | 72 ± 5 | 32 ± 5 (55.5) | 14 ± 2 (42.1) | 48.8 |
| Wood vinegar + orange guard (1:9) 500× | 103 ± 4 | 35 ± 1 (65.8) | 8 ± 1 (76.9) | 71.4 |
| CK | 131 ± 5 | 130 ± 6 (-) | 44 ± 3 | - |

[z] Number (mean ± SD) of larvae and adults per ten leaves.

表 **7.** 非農藥物質與農藥防治甜椒絲粉介殼蟲的防治效果。

**Table 7.** Efficacy of different non-pesticide substances and pesticids for the control of *Ferrisia virgata* on sweet pepper.

| Treatment | No. of mites[z] (control rate, %) | | | Mean of control rate (%) |
|---|---|---|---|---|
| | Before treatment | 7 d after treatment 1st | 7 d after treatment 2nd | |
| Mineral oil 500× | 42 ± 5 | 36 ± 2 (30.2) | 52 ± 3 (54.2) | 42.2 |
| Diatom powder 500× | 42 ± 1 | 18 ± 3 (65.1) | 25 ± 3 (78.0) | 71.6 |
| 40% methidathion EC 800× | 47 ± 3 | 22 ± 4 (61.9) | 41 ± 2 (67.7) | 64.8 |
| 20% dinotefuran SG 3,000× | 37 ± 3 | 12 ± 3 (73.6) | 18 ± 3 (82.0) | 77.8 |
| 9.65% spirotetramat SC 3,000× | 44 ± 2 | 14 ± 2 (74.1) | 16 ± 2 (86.6) | 80.4 |
| 24.7% thiamethoxam-cyhalothrin ZC 2,000× | 46 ± 3 | 20 ± 2 (64.6) | 25 ± 3 (79.9) | 72.3 |
| CK | 44 ± 3 | 54 ± 3 (-) | 119 ± 8 (-) | - |

[z] Number (mean ± SD) of larvae and adults per ten leaves.

及 86.6% 以上；24.7% 賽速洛寧 2,000 倍之防治率亦達到 79.9%。而非農藥的矽藻粉 500 倍防治率達 78.0% 效果，也相當不錯，可供採果期的防治參考。

## 討論

甜椒上之害蟲種類，依 Chen (1995)、Wang & Tu (1997) 及 Lu & Wang (2006) 報告指出，台灣地區甜椒與番椒上主要發生害蟲有棉蚜、茶細蟎、二點葉蟎、神澤氏葉蟎、斜紋夜蛾、台灣黃毒蛾、粗腳緣椿象、銀葉粉蝨及 *Phenacoccus* 屬之粉介殼蟲等害蟲。本次調查中增加了絲粉介殼蟲、柑桔粉介殼蟲、南黃薊馬、番茄斑潛蠅及番茄銹蜱等害蟲與害蟎，但並未發現二點葉蟎。其中，絲粉介殼蟲在本次調查中在甜椒植株上爲害嚴重，不只引起煤煙病，嚴重時甚至會造成植株死亡。茶細蟎主要發生在苗期及生育初期，爲害甜椒心葉。但其如何進入網室，依 Phyllis *et al.* (2003) 的報告指出可能是由粉蝨所帶入網室。本研究在調查期間，曾於苗期時發現粉蝨的成蟲，雖未發現粉蝨的若蟲在甜椒葉片上危害，卻發生茶細蟎的危害，所以在苗期應注重防治粉蝨成蟲的侵入，或可降低茶細蟎的危害。

在非農藥物質試驗中，供試的非農藥物質對於茶細蟎的防治效果，僅在窄域油 500 倍第一次處理後 7 日的防治率達 60% 以上。對於神澤氏葉蟎的防治率，除了無患子之外，其他供試的油類對葉蟎的防治率皆可達 78% 以上。在 Yu & Chen (2009) 測試 3 種植物油 (椰子油、棕櫚油及菜籽油) 的乳化液對二點葉蟎的致死效果，在處理後 72 小時的 $LC_{50}$ 及 $LC_{90}$ 分別爲 2.23–3.66 mL $L^{-1}$ 與 7.53–7.82 mL $L^{-1}$ 之間，而本試驗以窄域油及葵花油處理後 7 日，對茶細蟎的防治試驗中的 $LC_{50}$ 經換算約爲 2.0 mL $L^{-1}$，與前者的結果相近；若以供試的窄域油、葵花油及苦楝油 2 mL $L^{-1}$ 防治神澤氏葉蟎試驗，其防治率皆可達 80%，防治效果優於前者。本試驗中以相同的供試物質防治南黃薊馬，其防治效果則不理想。Choi *et al.* (2004) 曾大量篩選 53 種植物精油對二點葉蟎的致死效果，其結果發現若以複方，可以結合多種作用機制產生協力作用。因此，本試驗考慮以不同組合的非農藥物質處理，來進行對南黃薊馬的的防治試驗；其中，各處理均添加木醋液，希望以氣味將薊馬驅出以接觸到藥液，增加防治的效果。結果發現，除了無患子加木醋液的效果較差外，其他的組合處理對薊馬的防治率皆達 65–76%。以上試驗結果，可提供農民在採收期間防治蟲害的參考，且可減少農藥的施用次數。本試驗調查中，絲粉介殼蟲類若在甜椒的採收期間發生較多，將會引起煤煙病而造成污染果實，若是危害嚴重則可致植株衰弱而死亡。另外，粉介殼蟲因蟲體覆蓋一層臘粉，能保護蟲體不被藥液接觸，因此施藥不易達到效果。以非農藥物質矽藻粉防治絲粉介殼蟲時，因爲矽藻粉是以物理性造成介殼蟲死亡，連續施用矽藻粉 500 倍 2 次後 7 日的防治率可達 78%，於甜椒採收期施用具有極高的安全性。

甜椒栽培模式是屬連續性採收，在網室中同時可見幼果及待採收的成熟果，因此對於蟲害的藥劑防治著實不易。且現今可供農民防治甜椒病蟲害的藥劑並不多，針對甜椒上的重要害蟎，篩選蔬菜上的 4 種殺蟎劑，結果對茶細蟎的防治效果必需要連續施藥 2 次後 7 日的防治率才達 61–97%。而以四種殺蟎劑對茶葉蟎的防治效果，在連續施藥 2 次後 7 日的防治率爲 83–100%，其防治效果頗佳，可以提供給農民參考。篩選防治絲粉介殼蟲藥劑的試驗結果，在第一次施藥後 7 日的防治率，20% 達特南 3,000 倍及 9.65% 賜派滅 3,000 倍的防治率達 70% 以上較好，連續施藥 2 次後 7 日的效果可提高至 80% 以上。

針對以上結果，藥劑的防治效果大多優於非農藥物質的防治效果，可先以藥劑將害蟲與害蟎田間的族群密度壓低，再施以非農藥物質防治，就可減少藥劑的施用。如在茶細蟎與絲粉介殼蟲的防治方式，需連續施藥才可提高防治效果，因此在栽培初期可先以藥

劑防治茶細蟎，將族群密度降低，於果實採收期，則可考慮在 2 次藥劑施用間，噴施非農藥物質 2 至 3 次，減少藥劑的施用。雖然非農藥物質的防治效果不如農藥的速效，但以甜椒的栽培採收方式，將藥劑與施用非農藥輪替使用，不僅可以減少農藥的施用次數，也可減少農藥殘留的問題。

## 誌謝

本試驗期間承本研究室同仁謝淑婷、潘瑞錦小姐及胡登淵先生協助試驗調查、試驗植物的栽培管理及噴藥等試驗相關工作，在此一併致謝。

## 引用文獻

Babu, T. R., V. S. Reddy, and S. H. Hussaini. 1989. Effect of edible and non edible oil on the development of the pulses beetle *Callosobruchus chinensis* (L.) and on viability and yield of mungbean [*Vigna radiate* (L.)]. Trop. Sci. 29:215–220.

Butler, G. D., Jr., S. N. Puri, and T. J. Henneberry. 1991. Plant-derived oil and detergent solutions as control sgents for *Bemisia tabasi* and *Aphis gossypii* on cotton. Southwest. Entomol. 16:331–337.

Chen, W. S. 1995. Sweet pepper and chilly pepper. p.225–226. *in*: Taiwan Agriculture Encyclopedia (Crop edition-3). (Hung, B. F., ed.) Harvest Farm Magazine Pub. Taipei. 520 pp. (in Chinese)

Choi, W., S. G. Lee, H. M. Park, and Y. J. Ahn. 2004. Toxicity of plant essential oils to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytosetulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). J. Econ. Entomol. 97:553–558.

Henderson, C. F. and E. W. Tilton. 1955. Tests with acaricides against the brow wheat mite. J. Econ. Entomol. 48:157–161.

Herron, G. A., G. A. C. Beattie, A. Kallianpur, and I. Barchia. 1998. A potter spray tower bioassay of two petroleum spray oil against adult female *Panonychus ulmi* (Koch) and *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Exp. Appl. Acarol. 22:553–558.

Hewlett, P. S. 1975. Lethal action of a refined mineral oil on adult *Sitophilus granarius* (L.). J. Stored Prod. Res. 11:119–120.

Lu, C. T. and C. L. Wang. 2006. Control effect of *Mallada basalis* on insect pests of nethouse sweet pepper. J. Taiwan Agric. Res. 55:111–120. (in Chinese with English abstract)

Nicetic, O., D. M. Watson, G. A. C. Beattie, A. Meats, and J. Zheng. 2001. Integrated pest management of two-spotted mite *Tetranychus urticae* on greenhouse roses using petroleum spray oil and the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. Exp. Appl. Acarol. 25:37–53.

Pertot, I., R. Zasso, L. Amsalem, M. Baldessari, G. Angeli, and Y. Elad. 2008. Integrating biocontrol agents in strawberry powdery mildew control strategies in high tunnel growing systems. Crop Prot. 27:622–631.

Phyllis, G. W., S. Kleitman, R. Mori, N. Shapira, and E. Palevsky. 2003. Control of the broad mite [*Polyphagotarsonemus latus* (Banks)] on organic greenhouse sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) with the predatory mite, *Neoseiulus cucumeris* (Oudemans). Biol. Control 27:300–309.

Schoonhoven, A. V. 1978. The use of vegetable oils to protect store beans from bruchid attack. J. Econ. Entomol. 71:254–725.

Wang, C. L. 2010. Nonsynthetic Resources for Pest Management. Taiwan Agric. Res. Inst. Special Pub. No.142. Taichung. 183 pp. (in Chinese)

Wang, S. S. and D. I. Tu. 1997. Fruits and vegetables class sweet pepper and hot pepper fruits. p.31–39. *in*: The Special Publication on the Vegetable Insect Pest for the IPM. (Huang, Y. C., Y. H. Huang, H. Y. Chen, K. Y. Fan, and Y. F. Wu, eds.) Department of Agriculture and Forestry, Taiwan Provincial Government Pub. Nantou. 220 pp. (in Chinese)

Yu, J. Z. 2009. Aphicidal efficacy of Emulsified soybean oil against *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). J. Taiwan Agric. Res. 58:265–272. (in Chinese with English abstract)

Yu, J. Z. and B. H. Chen.2009. Acaricidal efficacy of three vegetable oils on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). J. Taiwan Agric. Res. 58:136–145. (in Chinese with English abstract)

# Survey on the Insect and Mite Pests of Sweet Pepper Grown in Net House and Selection of Chemicals for Pest Control

Hsiou-Hua Hao[1,*]

## Abstract

Hao, H. H. 2012. Survey on the insect and mite pests of sweet pepper grown in net house and selection of chemicals for pest control. J. Taiwan Agric. Res. 62(2):165–173.

Cultivation of sweet pepper under net house may significantly block the access of many large size insect pests to the plants, yet the small ones would occur severely in the net house when rainfall is rare. This study was conducted to investigate the effect of cultivation practices on the occurrence of pest types of sweet pepper and to screen out chemicals and synthetic substances for controlling these pests. Results showed that aphid, thrip, mealy bug, spider mite and broad mite were found both inside and outside net house and in the open-field where sweet pepper were grown, but were prevailing inside the net house. Whereas, spiraling white fly, tomato leaf miner and big moth occurred only in the open-field. By the use of mixed synthetic substances to control broad mite, it indicated that mineral oil and soapberry to mix with sunflower oil or wood vinegar obtained a substantial control effect, with the control rates of 59.7%, 49.4% and 48.7%, respectively. Of the five mixed synthetic substances, the control rate reached more than 80% on kanzawa spider mite by using sulfur power, mineral oil, soapberry in sunflower oil and neem oil. Among four tested acaricides, 1,500× milbemectin 1% EC (emulsifiable concentrate) had the highest control rate (89.3%) for broad mite, followed by 2,000× abamectin 2% EC (86.9%). For the control of spider mites, 4,000× etoxazole 10% SC (suspension concentrate) and 1,500× milbemectin 1% EC (98.4%) were equally effective. As to the control of southern yellow thrip, the synthetic substance using wood vinegar mixed with mineral oil had better efficacy (76.4%) than that mixed with sunflower oil (72.8). To control mealybug, 3,000× dinotefuran 20% SG (water-soluble granules) and 3,000× movento 9.65% SC were the better choices among pesticides, with the control rate higher than 77%. It was 500× diatom powder that had the best efficacy among the mixed synthetic substances for mealybug control.

**Key words:** Sweet pepper, Pest, Control, Non-pesticide substances, Pesticide.

Received: January 16, 2013; Accepted: April 18, 2013.

* Corresponding author, e-mail: hao@fthes-tari.gov.tw

1 Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(2):174–183 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06202.07

# 不同貯藏溫度條件對鮮藷品質之影響

利幸貞 [1,*]

## 摘要

利幸貞。2013。不同貯藏溫度條件對鮮藷品質之影響。台灣農業研究 62(2):174–183。

甘藷塊根於貯藏期間，將因為貯藏環境的溫度條件，使其食用品質受到影響。本文研究以不同貯藏溫度 (10、15 及 20℃) 及貯藏時間 (2、4、6 及 8 週) 等環境條件，探討不同甘藷品種 (‘台農 57 號’、‘台農 66 號’ 及 ‘台農 73 號’) 在貯藏期間的鮮藷品質變化。試驗結果顯示，15℃貯藏處理可有效抑制塊根貯藏期間的萌芽，無論品種與貯藏溫度，甘藷塊根概於貯藏至第 8 週時出現明顯鮮重降低現象，顯著低於未經貯藏處理者。甘藷品種之間，‘台農 57 號’ 塊根失重情形低於 ‘台農 66 號’ 及 ‘台農 73 號’。10℃處理將對供試甘藷品種造成貯藏期間鮮藷塊根的寒害徵狀，‘台農 57 號’ 及 ‘台農 66 號’ 主要發生於塊根表皮，出現凹陷與褐變，而 ‘台農 73 號’ 藷肉則出現水浸狀生理劣變致無食用價值。此外，高溫貯藏條件及延長貯藏時間，將不利於 ‘台農 73 號’ 鮮藷花青素的保存。三個供試品種鮮藷在貯藏期間的成分變化，其可溶性糖含量在貯藏 2 週後，10℃、15℃及 20℃等三種處理均顯著高於對照樣品，此增加趨勢維持至貯藏第 8 週；粗脂肪與蛋白質含量亦有相同的趨勢。低乾物率甘藷品種具有呼吸速率較高之特性，而 ‘台農 66 號’ 甘藷乾物率較其他兩個供試品種低。相較於 ‘台農 57 號’ 及 ‘台農 73 號’，試驗貯藏期間 ‘台農 66 號’ 澱粉含量較低而可溶性糖含量則明顯較高。將不同的甘藷品種、貯藏溫度及貯藏時間等三個因子對於鮮藷化學成分影響結果進行變方分析，顯示鮮藷之成分變化受到品種、貯藏溫度及貯藏時間影響，且各處理因子間交感效應顯著，據此維持鮮藷品質成分的最適貯藏溫度條件必須依品種不同而設定。

**關鍵詞**：甘藷、貯藏、萌芽、寒害、生理劣變。

## 前言

甘藷是世界上重要的糧食作物，根據聯合國糧農組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) 一項 2002 年的報告 (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2002) 指出，約 92% 的甘藷產自於亞洲及太平洋諸島。熱帶型氣候下，甘藷由產地採收後運至消費市場的過程中，其運輸與貯藏對塊根品質維持極爲重要。歸納影響甘藷採後新鮮塊根貯藏的問題，主要包括機械採收造成的塊根損傷、貯藏期間鮮重的減少、塊根的發芽及病蟲害造成貯藏期間的耗損等四項 (Walter *et al.* 1989; Ray & Ravi 2005)。台灣地處亞熱帶型氣候，雖然甘藷一年四季均可栽植，但栽培時期主要集中於中南部秋裡作，且品種單一化與產季過於集中極易導致產銷失衡問題。因此，本研究期以系列研究探討與釐清貯藏期間可能遭遇到的瓶頸，來延長鮮藷貯藏時間並維持貯藏品質，達到微調生產期與增加產值之目的，同時亦將究明經過貯藏後的鮮藷塊根於加工烘烤時對品質的可能影響。

根據前人研究所設定的貯藏處理條件，Onwueme (1978) 認爲 13–16℃是甘藷貯藏適溫，Cantwell & Kasmire (1985) 在有關根莖類採後處理的研究提出甘藷適合的貯藏溫度爲 12–14℃、相對濕度 85–90%，Picha (1986a) 則

投稿日期：2012 年 12 月 22 日；接受日期：2013 年 4 月 24 日。
[*] 通訊作者：hsinchen@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系助理研究員。台灣 嘉義市。

指出溫度 15.6℃、相對濕度 90% 頗適合貯藏甘藷。Takahata *et al.* (1995) 利用採收季節的天然溫度進行甘藷貯藏，發現適溫約 12–16℃。Zhang *et al.* (2002) 以貯藏溫度 20℃、相對濕度 75% 進行甘藷貯藏試驗，亦獲得不錯的貯藏效果。歸納以上所應用的貯藏溫度範圍，約介於 12–20℃，而相對濕度則介於 75–90% 之間。本研究以台灣主要栽培品種為材料，探討不同的貯藏溫度與貯藏時間處理對鮮藷發芽、塊根失重率及化學成分含量的影響，藉以瞭解甘藷品種、貯藏溫度及貯藏時間等處理因子的貯藏效果，以及因子之間的交感影響。

# 材料與方法

## 鮮藷之貯藏處理

本研究以 2011 年 2 月於農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所之甘藷試驗田採收的 2010 年秋作種植的甘藷為試材，計有 ‘台農 57 號’、‘台農 66 號’ 及 ‘台農 73 號’ 等三個品種。貯藏環境設定相對濕度為 80–85%，貯藏溫度則為 10℃、15℃及 20℃等三種。將甘藷塊根採收後以清水洗淨表皮，置於陰涼處待表皮風乾後進行貯藏試驗。鮮藷樣品每品種塊根取樣數各 60 個，皆於採收當日逐一編號及記錄鮮重，且於貯藏期間每週再逐一秤其重量改變，分別記錄其鮮重變化以估算塊根失重率，同時觀察塊根萌芽情形。又分別於貯藏期間第 2 週、4 週、6 週及 8 週，將每一溫度處理下的每個品種逢機取出鮮藷塊根 5 個為樣品，經冷凍乾燥 (model FD24-4S, Kingmech Co., Taiwan) 後磨粉，經以 40 目網篩過篩後進行鮮藷化學成分之分析。試驗期間每品種另於採收後收取 5 個未貯藏之塊根作為對照組，加上前述 3 個貯藏溫度處理，共計調查 195 個樣品。

## 鮮藷成分之化學分析

鮮藷貯藏期間，各品種之不同貯藏溫度處理每 2 週分別逢機取出 5 個鮮藷塊根，經過冷凍乾燥過篩之粉狀樣品，各取 0.1 g 進行可溶性糖及澱粉含量測定 (Phenol-$H_2SO_4$ method; Dubois *et al.* 1956)，以微電腦分光光度計 (scanning spectrophotometer, Genesys™10 UV, ThermoSpectronic, USA) 於波長 490 nm 測定吸光值。另取樣品 3.0 g 進行粗脂肪含量測定 (Soxtec system 2045, Foss Tecator, Sweden)，取樣品 0.001 g 以元素分析儀 (elemental analyzer, Thermo Flash EA™ 1112, Thermo Fisher Scientific, Italy) 進行蛋白質含量測定。又取 9 g 進行粗花青素含量測定 (acidic ethanol extraction method; Lien *et al.* 2010)，以微電腦分光光度計 (Genesys™10 UV, ThermoSpectronic, USA) 於波長 532 nm 測定吸光值。未貯藏處理之三個甘藷品種對照組，亦一併進行成分之化學分析。

## 統計分析

本試驗相關資料數據之整理與分析均利用 SAS/STAT (8.0) 軟體進行，應用 PROC means 程式分析相關數據平均值，以 PROC glm 程式進行變方分析 (analysis of variance) 及最小顯著性測驗 (least significant difference test)。

# 結果

## 不同貯藏溫度處理之貯藏期間塊根萌芽率調查

‘台農 57 號’、‘台農 66 號’ 及 ‘台農 73 號’ 品種鮮藷塊根萌芽，會受到不同貯藏溫度處理之影響，如圖 1 所示。三個供試品種於 10℃及 15℃處理條件下，貯藏 8 週期間均未有萌芽情形發生。而 20℃處理條件下，‘台農 57 號’ 在第 2 週時塊根開始出現萌芽，萌芽率 16.6%，隨著貯藏時間延長至第 8 週時塊根累計萌芽率可達 53.3%，乃三個供試品種中萌芽率最高者。‘台農 66 號’ 在貯藏第 2 週才出現萌芽，惟萌芽率僅 6.7%，且隨著貯藏時間至第 8 週時累計萌芽率並未再增加，乃三個供試品種中萌芽率最低的品種。至於 ‘台農 73 號’，則在貯藏第 4 週時才開始出現萌芽，萌芽率 8.3%，且隨著貯藏時間延長至第 8 週時塊根累計萌芽率為 26.7% (圖 1)。

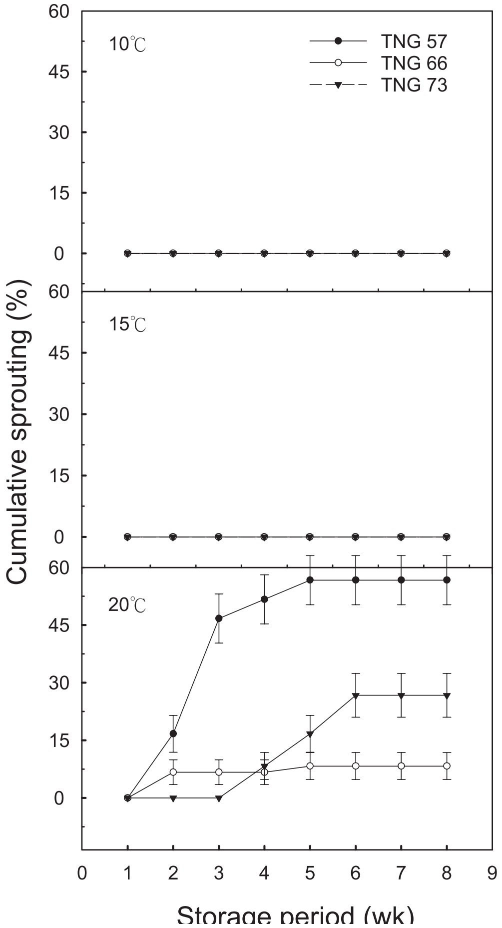


**圖 1.** 貯藏溫度處理對 '台農 57 號'、'台農 66 號' 及 '台農 73 號' 等三個甘藷品種鮮藷 (塊根) 貯藏期間萌芽率之影響。

**Fig. 1.** Effect of storage temperatures on sprouting percentage of tuberous roots in three different cultivars of sweet potato, 'TNG 57', 'TNG 66' and 'TNG 73', during storage period.

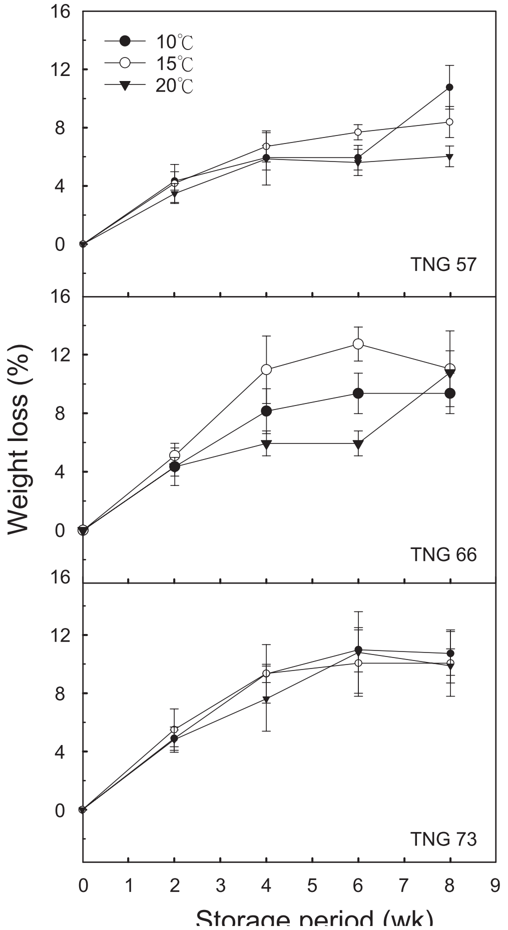


**圖 2.** 貯藏溫度處理對 '台農 57 號'、'台農 66 號' 及 '台農 73 號' 等三個甘藷品種鮮藷 (塊根) 貯藏期間失重率之影響。

**Fig. 2.** Effect of storage temperatures on weight loss of tuberous roots in three different cultivars of sweet potato, 'TNG 57', 'TNG 66' and 'TNG 73', during storage period. Bars indicate standard deviation. Means separation on sampling day by least significant difference test at $P \leq 0.05$.

## 不同貯藏溫度處理之貯藏期間鮮藷失重率比較

參試三品種之鮮藷在 3 個貯藏溫度處理下，隨著貯藏期延長其失重率均有增加的趨勢 (圖 2)。自採收後至貯藏到第 4 週期間，鮮藷之失重率皆快速增加，惟貯藏至第 8 週時，此三甘藷品種塊根在 3 個處理溫度下之失重率則無明顯差異。參照前述試驗結果，顯見無論是品種與貯藏溫度，甘藷塊根於貯藏至第 8 週時鮮重均較未經貯藏處理樣品明顯減少，品種間以 '台農 57 號' 塊根失重情形較 '台農 66 號' 及 '台農 73 號' 輕微。

## 不同貯藏溫度處理之貯藏期間塊根寒害差異

三甘藷品種之鮮藷於 10℃ 貯藏溫度處理下，至第 4 週時即出現明顯寒害徵狀 (圖 3)。其中 '台農 57 號' 及 '台農 66 號' 兩品種主要寒害徵狀出現於表皮，呈現褐色且凹陷，但

藷肉影響不明顯；而 ‘台農 73 號’ 之寒害徵狀則主要發生於藷肉內，由中心部位開始呈水浸狀生理劣變現象 (translucency breakdown)，嚴重時則整個塊根失去食用品質。

## 不同貯藏溫度處理及貯藏時間對鮮藷化學成分影響

**可溶性糖含量：**三甘藷品種之鮮藷在貯藏期間，其可溶性糖含量在貯藏 2 週後，10℃、15℃及 20℃等 3 個貯藏溫度處理均顯著高於對照組樣品，且此增加趨勢維持至貯藏第 8 週 (圖 4)。此三個品種皆以 10℃貯藏溫度處理的可溶性糖含量最高，而 15℃及 20℃兩處理在 2 至 8 週期間之變化並不顯著。比較品種間差異，以 ‘台農 66 號’ 鮮藷之可溶性糖含量最高。

**澱粉含量：**‘台農 57 號’ 澱粉含量在貯藏至第 8 週時，10℃、15℃及 20℃等 3 個貯藏溫度處理均顯著呈現下降趨勢 (圖 5)。經比較品種間變化，則以 ‘台農 66 號’ 鮮藷之澱粉含量較低。

**粗脂肪含量：**此三個甘藷品種之鮮藷粗脂肪含量在貯藏至第 2 週時，3 個溫度處理均較對照組樣品顯著增加，然而貯藏至第 8 週時，‘台農 57 號’ 以 10℃處理較 15℃及 20℃兩處理為高 (圖 6)；‘台農 66 號’ 及 ‘台農 73 號’ 在貯藏至第 8 週時，不同溫度處理間粗脂肪含

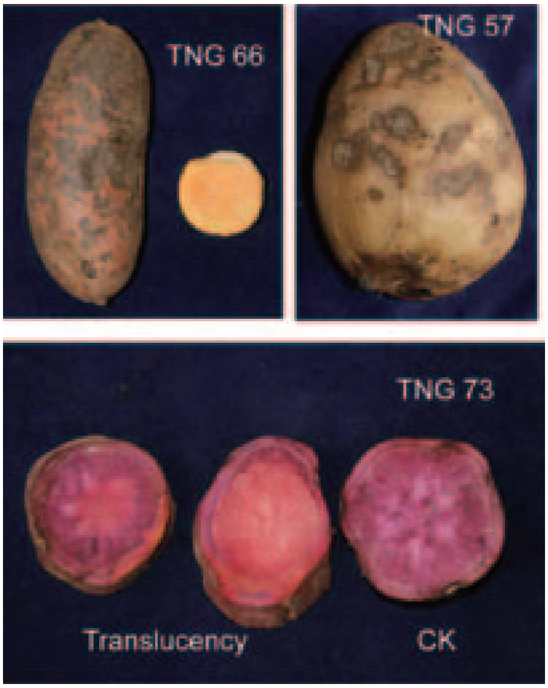


圖 3. 低溫 10℃貯藏 4 週之 ‘台農 57 號’、‘台農 66 號’ 及 ‘台農 73 號’ 甘藷之鮮藷 (塊根) 寒害徵狀。

**Fig. 3.** The chilling injury symptoms of tuberous roots in three different cultivars of sweet potato, ‘TNG 57’, ‘TNG 66’ and ‘TNG 73’, after a storage period of 4 weeks at 10℃ .

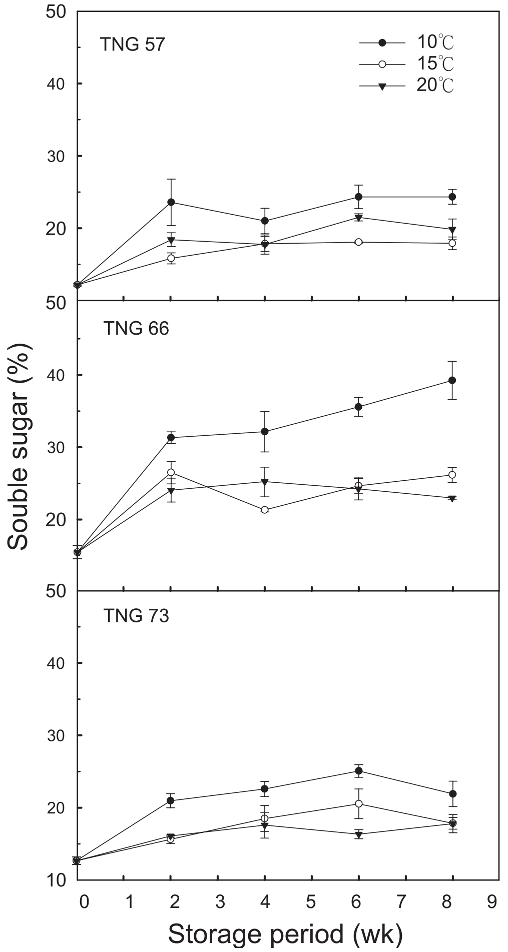


圖 4. 甘藷品種、貯藏溫度及貯藏時間對鮮藷可溶性糖含量之影響。

**Fig. 4.** Effect of storage temperatures on soluble sugar content in three different cultivars of sweet potato, ‘TNG 57’, ‘TNG 66’ and ‘TNG 73’, during storage period.

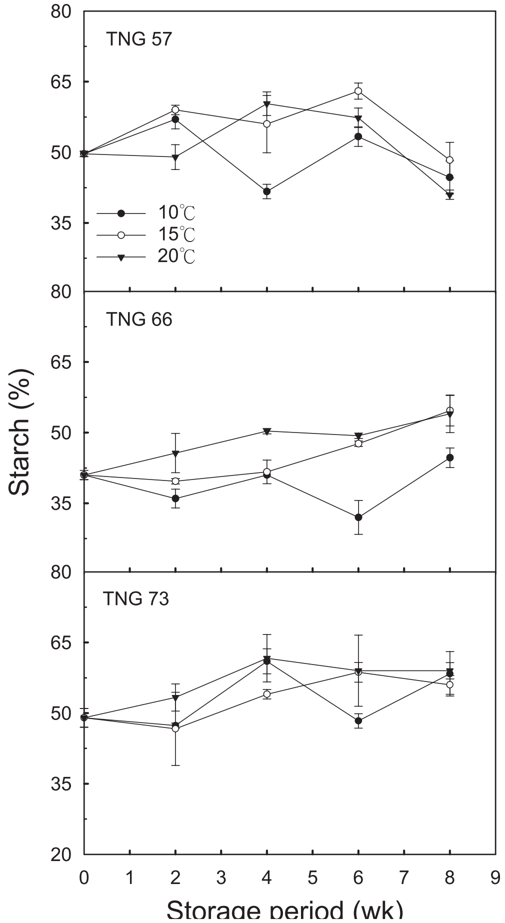


圖 5.　甘藷品種、貯藏溫度及貯藏時間對鮮藷澱粉含量之影響。

**Fig. 5.** Effect of storage temperatures on starch content in three different cultivars of sweet potato, ‘TNG 57’, ‘TNG 66’ and ‘TNG 73’, during storage period.

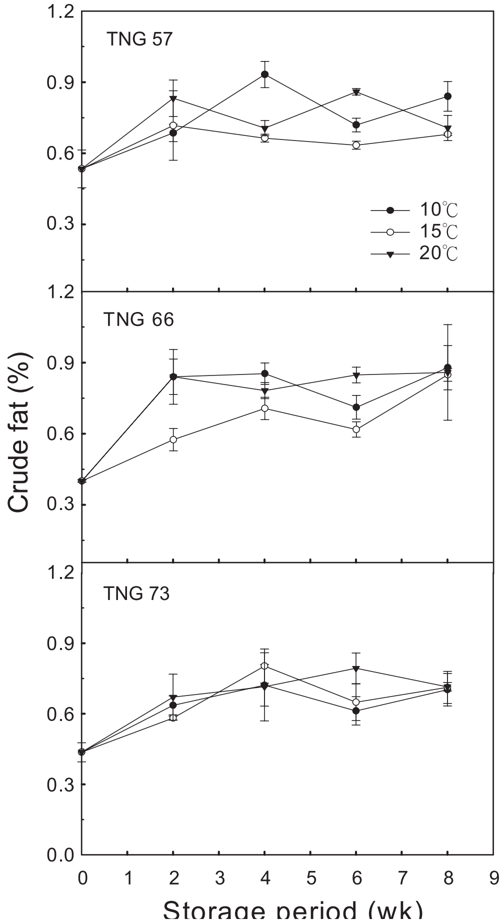


圖 6.　甘藷品種、貯藏溫度及貯藏時間對鮮藷粗脂肪含量之影響。

**Fig. 6.** Effect of storage temperatures on crude fat content in three different cultivars of sweet potato, ‘TNG 57’, ‘TNG 66’ and ‘TNG 73’, during storage period.

量並無顯著差異。品種之間，以 ‘台農 73 號’ 之鮮藷粗脂肪含量較低。

**蛋白質含量：**‘台農 57 號’ 之鮮藷貯藏至第 2 週時，蛋白質含量於 10℃、15℃及 20℃等 3 個貯藏溫度處理下，皆較對照組樣品顯著增加，第 4 至第 8 週期間則逐漸下降 (圖 7)。溫度處理間，以 10℃處理變化較大，另兩甘藷品種之鮮藷亦均有相似變化趨勢。

**花青素含量：**供試品種中僅 ‘台農 73 號’ 之塊根含有花青素，藷肉呈紫色。試驗期間該品種之塊根花青素含量明顯隨著貯藏時間延長而下降，10℃、15℃及 20℃等 3 個貯藏溫度處理皆呈現相同趨勢 (圖 8)。經比較溫度處理間差異，顯示高溫貯藏條件不利於塊根花青素的維持。

## 不同貯藏溫度處理及貯藏時間造成鮮藷化學成分影響之品種差異分析

表 1 為三個處理因子 (品種、貯藏溫度及貯藏時間) 對鮮藷化學成分效應之變方分析，結果顯示此三個處理因子對所分析的鮮藷化學成分之交感效應及個別效應均呈顯著。將此三個不同甘藷品種分別進行貯藏溫度及貯藏時間處理對其化學成分影響之分析，發現

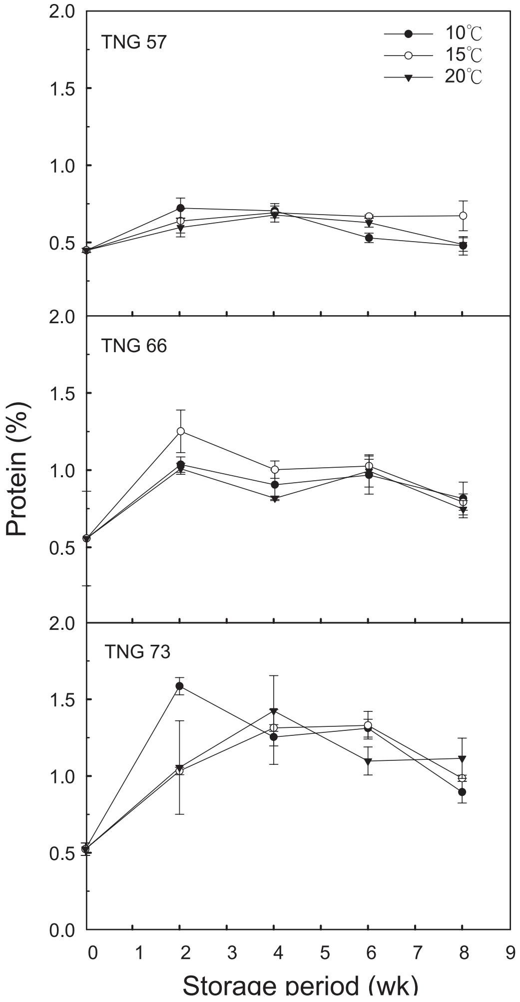


**圖 7.** 甘藷品種、貯藏溫度及貯藏時間對鮮藷蛋白質含量之影響。

**Fig. 7.** Effect of storage temperatures on protein content in three different cultivars of sweet potato, ‘TNG 57’, ‘TNG 66’ and ‘TNG 73’, during storage period.

貯藏溫度處理對 ‘台農 57 號’ 之鮮藷可溶性糖、澱粉、粗脂肪及蛋白質等含量皆呈現顯著效應，而貯藏時間對可溶性糖、澱粉及蛋白質等含量亦皆呈現顯著效應，其中澱粉、粗脂肪及蛋白質等含量在貯藏溫度及貯藏時間長短處理因子間交感作用顯著 (表 2)。貯藏溫度與貯藏時間處理對 ‘台農 66 號’ 之鮮藷可溶性糖、澱粉、粗脂肪及蛋白質等含量具顯著影響，且可溶性糖及澱粉含量在貯藏溫度及貯藏時間處理因子間交感作用顯著。貯藏

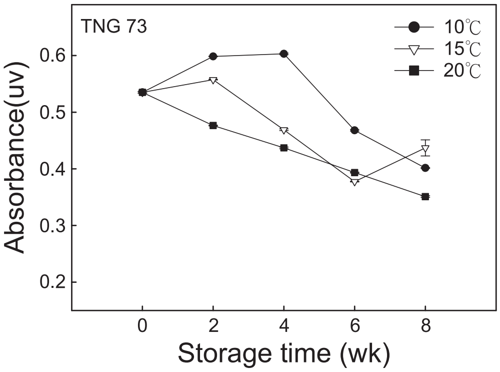


**圖 8.** 貯藏溫度對於貯藏期間 ‘台農 73 號’ 甘藷花青素含量之影響。

**Fig. 8.** Effect of storage temperatures on anthocyanin content of sweet potato ‘TNG 73’, during storage period. Bars indicate standard deviation. Means separation on sampling day by least significant difference test at $P \leq 0.05$.

溫度處理對 ‘台農 73 號’ 之鮮藷可溶性糖、澱粉等含量效應皆呈現顯著，而貯藏時間則對可溶性糖、澱粉、粗脂肪、蛋白質等含量之效應呈現顯著。

## 討論

本試驗結果顯示，10℃及 15℃之貯藏溫度條件均可抑制甘藷塊根於貯藏期間萌芽，但 10℃貯藏溫度對試驗的三個甘藷品種皆會造成塊根之寒害。因此，欲抑制貯藏期間塊根的萌芽，無論是 ‘台農 57 號’、‘台農 66 號’ 及 ‘台農 73 號’ 皆以 15℃貯藏溫度處理最佳。20℃貯藏溫度抑制 ‘台農 57 號’ 萌芽之效果不佳，雖可延遲 ‘台農 73 號’ 之萌芽時間，但至貯藏 6 周後累計萌芽率仍達 26.7%。貯藏溫度對 ‘台農 66 號’ 萌芽抑制效果，相較於其他兩試驗品種表現出相對耐高溫貯藏的趨勢。

其次，貯藏將會造成塊根重量的減少，主要是源自於呼吸作用與蒸散作用，而蒸散作用則是因塊根與貯藏環境間蒸散壓差造成鮮藷所含水分蒸發引起。以剛採收的甘藷呼吸速率最高，但會隨著貯藏時間而逐漸減緩 (Picha 1986b, 1987; Walter *et al.* 1989)。Onwueme (1978) 的研究認爲貯藏溫度高於 16℃則鮮藷呼吸速率提高、塊根乾物率下降，本

表 1. 品種、貯藏溫度及貯藏時間對鮮藷化學成分影響之變方分析。

**Table 1.** Analysis of variations of the effects of storage temperature, storage period and cultivar on the chemical components of tuberous roots in three different cultivars of sweet potato.

| Source of variance | df | SS[z] | STA | FAT | EA |
|---|---|---|---|---|---|
| Cultivar (C) | 2 | 806.17** | 1,081.1** | 0.072** | 2.993** |
| Temperature (T) | 2 | 543.49** | 391.3** | 0.091** | 0.038* |
| Storage period (d) | 3 | 29.58** | 89.6** | 0.028** | 0.270** |
| C × T | 4 | 43.63** | 130.4** | 0.022** | 0.032** |
| C × d | 6 | 7.24** | 279.6** | 0.013* | 0.053** |
| T × d | 6 | 5.31* | 86.6** | 0.035** | 0.043** |
| C × T × d | 12 | 11.90** | 50.4** | 0.011* | 0.054** |

[z] SS: soluble sugar; STA: starch; FAT: crude fat; EA: protein.
*, ** Significant at 5% and 1% levels, respectively.

表 2. 貯藏時間及貯藏溫度對不同品種鮮藷化學成分之交感效應。

**Table 2.** Interactions among storage temperature, storage period and cultivar on the chemical components of tuberous roots in three different cultivars of sweet potato.

| Source of variance | df | SS[y] | STA | FAT | EA |
|---|---|---|---|---|---|
| TNG 57 | | | | | |
| T[z] | 2 | 108.20** | 168.69** | 0.049** | 0.017** |
| d | 3 | 12.00** | 290.00** | 0.001 | 0.035** |
| T × d | 6 | 3.58 | 104.25** | 0.030** | 0.016** |
| TNG 66 | | | | | |
| T | 2 | 415.11** | 403.86** | 0.077** | 0.051** |
| d | 3 | 16.73** | 186.70** | 0.031* | 0.159** |
| T × d | 6 | 20.86** | 39.01** | 0.017 | 0.012 |
| TNG 73 | | | | | |
| T | 2 | 107.44** | 79.53* | 0.009 | 0.034 |
| d | 3 | 15.32** | 171.96** | 0.022* | 0.182** |
| T × d | 6 | 4.67 | 44.27 | 0.011 | 0.123** |

[z] T: storage temperature; d: storage period.
[y] SS: soluble sugar; STA: starch; FAT: crude fat; EA: protein.
*, ** Significant at 5% and 1% levels, respectively.

試驗鮮藷 (塊根) 的失重率隨著貯藏時間延長而增加，且表皮外觀皺縮應與塊根含水量減少及塊根呼吸作用有關。在較高的相對濕度 (85–90% RH) 下，將有利於降低甘藷的失重速率 (Ray & Ravi 2005)，而觀察本試驗 3 個貯藏溫度處理下三個甘藷品種表現，相對濕度 80–85% 可能並非其最適條件。為期延緩表皮皺縮影響外觀及改善貯藏期間塊根的失重，提高貯藏環境的相對濕度以減緩塊根水分蒸發仍有探討空間。Sistrunk (1977) 將甘藷經過 2℃、85–90% RH 處理後再放至 24℃、85–90% RH 環境下貯藏，經 2℃處理 2 d 的塊根即發生寒害徵狀。

本試驗結果也顯示，甘藷並不適合 15℃以下之低溫貯藏。雖然 10℃貯藏溫度處理下三個參試品種之鮮藷可溶性糖含量隨著貯藏時間延長而顯著增加，且含量均高於 20℃處理，也完全能抑制鮮藷之萌芽，但此低溫對於此三甘藷品種皆會造成貯藏期間塊根之寒害徵狀，尤其 ‘台農 73 號’ 藷肉將呈嚴重水浸狀而無食用價值。而 20℃貯藏溫度處理無法抑制鮮藷之萌芽，尤其是 ‘台農 57 號’ 萌芽

情形最嚴重，‘台農 73 號’ 不但貯藏後期萌芽率增加且花青素含量降解情形嚴重。此兩個品種以 15℃貯藏溫度處理，對鮮藷品質維持可優於 10℃與 20℃兩處理。‘台農 66 號’ 在 20℃貯藏溫度處理下，雖然可溶性糖含量會下降但塊根失重率較低，惟其塊根萌芽率僅 6.7%，相較於其他兩個供試品種，‘台農 66 號’ 鮮藷仍具有較耐高溫 (20℃) 貯藏的趨勢。

不同貯藏溫度處理下，三個甘藷品種之鮮藷可溶性糖含量提高，可能因澱粉在貯藏期間部分藉由澱粉水解酵素 (α-amylase) 及澱粉糖化酵素 (β-amylase) 轉化成可溶性糖之結果。澱粉糖化酵素是影響甘藷加熱處理過程中澱粉轉變成麥芽糖最重要的酵素，進而影響甘藷加工品質 (Biester *et al.* 1925; Picha 1985, 1986b; Takahata *et al.* 1994)，因此有關於貯藏期間鮮藷中的澱粉糖化酵素變化將會在未來試驗進一步分析、探討。澱粉含量佔甘藷乾物率的 60–70%，係最主要的成分，其次為可溶性糖，此兩種成分含量乃甘藷主要品質成分指標。以此兩成分含量為例，‘台農 66 號’ 與其他兩個供試甘藷品種比較其乾物率較低，可能因為其低乾物率特性於貯藏期間具有較高的呼吸速率 (Ray & Ravi 2005)。澱粉大部分轉化成可溶性糖以供細胞呼吸代謝所需，本貯藏試驗結果亦顯示 ‘台農 66 號’ 於貯藏期間之可溶性糖含量明顯高於 ‘台農 57 號’ 及 ‘台農 73 號’。

無論品種與貯藏期間，鮮藷之粗脂肪與蛋白質含量在貯藏 2 週後，此 3 個貯藏溫度處理下均顯著高於對照組，此增加趨勢維持至貯藏第 8 週。三個供試甘藷品種於貯藏期間，澱粉含量受到不同貯藏溫度處理影響，在貯藏期間含量變化趨勢因品種而異。綜合而言，鮮藷之成分變化同時受到品種、貯藏溫度及貯藏時間之影響，且各處理因子間交感效應顯著，故維持鮮藷品質成分的最適貯藏溫度條件必須依品種不同而設定。

## 引用文獻


Biester, A., M. W. Wood, and C. S. Wahlin. 1925. Carbohydrate studies I. The relative sweetness of pure sugars. Amer. J. Physiol. 73:387–396.

Cantwell, M. I. and R. F. Kasmire. 1985. Postharvest handling systems: Underground vegetables (roots, tubers, and bulbs). p.435–443. *in*: Postharvest Technology of Horticultural Crops. (Kader, A. A., ed.) University to California, Agriculture and Natural Resource Publ., Oakland. 535 pp.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, A. P. Robers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350–356.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002. Production Year Book. Vol. 54, FAO, Stat. Sec. 163, Food and Agric. Organization, United Nations, Rome. 336 pp.

Lien, C. Y., A. Y. F. Lee, C. F. Chan, Y. C. Lai, C. L. Huang, and W. C. Liao. 2010. Extraction parameter studies for anthocyanin extraction from purple sweet potato variety TNG 73, *Ipomoea Batatas*, *L.* Appl. Eng. Agric. 26:441–446.

Onwueme, I. C. 1978. The Tropical Tuber Crops: Yams, Cassava, Sweet Potato, and Cocoyams. Wiley, New York. 248 pp.

Picha, D. H.1985. HPLC determination of sugars on raw and baked sweet potatoes. J. Food Sci. 50:1189–1190.

Picha, D. H. 1986a. Sugar content of baked sweet potatoes from different cultivars and lengths of storage. J. Food Sci. 51:845–846.

Picha, D. H. 1986b. Weight loss in sweet potatoes during curing and storage: Contribution of the transpiration and respiration. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111:889–892.

Picha, D. H. 1987. Carbohydrate changes in sweet potatoes during curing and storage. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112:89–92.

Ray, R. C. and V. Ravi. 2005. Post harvest spoilage of sweet potato in tropics and control measures. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45:623–644.

Sistrunk, W. A. 1977. Relationship of storage, handling, and cooking method to color, hardcore tissue, and carbohydrate composition in sweet potatoes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102:381–384.

Takahata, Y., T. Noda., and T. Nagata. 1994. Effect of β-amylase stability and starch gelatinization during heating on varietal differences in maltose content in sweet potatoes. J. Agric. Food Chem. 42:2564–2569.

Takahata, Y., T. Noda, and T. Sato. 1995. Changes in carbohydrates and enzyme activities of sweet potato lines during storage. J. Agric. Food Chem. 43:1923–1928.

Walter, W. M., Jr., L. K. Hammlett, and F. G. Ciesberecht. 1989. Wound healing and weight loss of sweetpotatoes harvested at several soil temperatures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114:94–100.

Zhang, Z., C. C. Wheatley, and H. Corke. 2002. Biochemical changes during storage of sweet potato roots differing in dry matter content. Postharvest Biol. Technol. 24:317–325.

# Storage Temperature Affects Quality of Fresh Tuberous Roots of Sweet Potato during Storage Period

Hsin-Chen Li[1,*]

## Abstract

Li, H. C. 2013. Storage temperature affects quality of fresh tuberous roots of sweet potato during storage period. J. Taiwan Agric. Res. 62(2):174–183.

Quality of sweet potato is affected by the change of temperature during storage period. The objectives of the present study were to study how temperature affects quality of tuberous roots of three different sweet potato cultivars (‘TNG 57’, ‘TNG 66’ and ‘TNG 73’) during storage. Tuberous roots were stored at three temperatures (10, 15 or 20℃) and were sampled for physical traits investigation and chemical analysis at 2, 4, 6 and 8 weeks after storage. Results showed that the sprouting of tuberous roots (TR) was inhibited when stored at 15℃ or lower. Fresh weight of TR of all cultivars was significantly declined at eight wk after storage in these three temperatures, relative to those untreated ones, particularly ‘TNG 66’ and ‘TNG 73’. The symptoms of chilling injury occurred at 10℃ treatment; roots skin of ‘TNG 57’ and ‘TNG 66’ appeared sunken lesions and browning while translucent lesions occurred inside the core of roots in ‘TNG 73’ making the loss of market and eating value. To cultivar ‘TNG 73’, storage temperature of 20℃ and extended period of storage would decrease anthocyanin content. The chemical components of tuberous roots varied during storage. After storing 2 weeks at these three temperatures, contents of soluble sugar, crude fat and protein were significantly higher than those of untreated checks up to 8 weeks of storage. Cultivar ‘TNG 66’ had the lowest dry matter but was the highest in respiration rate relative to the other two. Moreover, ‘TNG 66’ also had lower starch with higher soluble sugar during storage period. By the analysis of variance on factors of cultivar, storage temperature and storage period with chemical components of tuberous roots, results showed that chemical components were affected by all these three factors and their interactions. Accordingly, results suggest that each sweet potato cultivar should have its specific temperature range to maintain proper tuberous roots storage.

**Key words:** *Ipomoea batatas* (L.) Lam, Storage, Sprouting, Chilling injury, Physiological deterioration.

---

Received: December 22, 2013; Accepted: April 24, 2013.
* Corresponding author, e-mail: hsinchen@dns.caes.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(2):184–194 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06202.08

# 利用薄膜培養基法檢測褐根病菌分泌之生體外分解酵素

蔡志濃[1] 鄭秀芳[2] 蔡惠玲[2] 黃鴻章[3] 謝文瑞[4] 安寶貞[5,*]

## 摘要

蔡志濃、鄭秀芳、蔡惠玲、黃鴻章、謝文瑞、安寶貞。2013。利用薄膜培養基法檢測褐根病菌分泌之生體外分解酵素。台灣農業研究 62(2):184–194。

褐根病為近年來台灣普遍發生的木本植物根部病害之一，被為害植物的根系組織嚴重腐敗。本文利用薄膜培養基測試法探討褐根病菌分泌 10 種細胞外泌酵素 (extracellular enzymes) 之能力。試驗結果顯示分別分離自南投縣、高雄市等地區所採集罹病植株之 5 支褐根病菌供試菌株 (PN18.1：分離自南投縣中興新村之櫸木；PN22.1：南投縣國姓鄉之木麻黄；PNG1.1：南投縣水里鄉之葡萄；PNP1.1：高雄市甲仙區之梅樹；及 PNZ1.1：高雄市阿蓮區之印度棗) 皆能分泌澱粉分解酵素 (amylase)、纖維分解酵素 (cellulase)、果膠分解酵素 [pectinases, 含 polygalacturonases (PGs) 與 pectate transeliminases (PTEs)]、蛋白分解酵素 (protease)、磷酸分解酵素 (phosphatase)、尿素分解酵素 (urease)、脂質分解酵素 (lipase) 及木質分解酵素 (laccase)；但不能分泌磷脂分解酵素 (phosphatidase) 與幾丁質分解酵素 (chitinase)。除木質分解酵素外，各菌株分泌各種分解酵素的能力隨酵素種類的不同而有強弱之差異，可達到 5% 顯著性水準。然而所有供試菌株分泌木質分解酵素的活性均甚高。本研究所建立褐根病菌分解酵素之檢測技術，可進一步應用於褐根病菌致病機制之研究。

**關鍵詞**：褐根病、褐根病菌、細胞外泌酵素、木質分解酵素、聚碳酸酯膜。

## 前言

褐根病 (Brown root rot) 由 *Phellinus noxius* (Corner) G. H. Cunningham 引起 (Cunningham 1965)，遍佈亞洲、非洲、大洋洲及澳洲等亞熱帶地區，其寄主範圍廣泛，包括果樹、木本觀賞植物及林木等，目前全世界有記錄之寄主植物超過 200 餘種 (Ann *et al.* 2002)。在台灣，澤田兼吉 (Sawada 1928) 曾於 1928 年最早記錄 16 種作物受褐根病菌爲害，當時菌名爲 *Fomes lamaensis* (Murr) Sacc. et Trott.。近年來調查之結果，顯示台灣已發現的寄主超過 130 餘種 (species) (Ann *et al.* 2002; Tsai 2008)，爲目前引起我國木本植物枯死之最重要根部病原菌 (Ann & Ko 1992; Ann *et. al.* 1999a, 1999b; Chang 1992; Tsu *et al.* 2002)。由於該病菌爲木材腐朽菌 (wood decay fungus)，在國際間研究較多者爲 laccase [木質分解酵素 (lignase) 之一種] (Geiger *et al.* 1985, 1986a, 1986b)，而其他分解酵素則較少 (Geiger *et al.* 1985,1986b)，尤其是生體外分解酵素。

本試驗即爲參考與修改 Hankin & Anagnostakis 開發的固體培養基酵素檢測法 (Hankin & Anagnostakis 1975, 1977)，探討該菌在固態培養基上分泌酵素的能力；然而該菌在固態培養基上菌絲生長密實，不容易觀察

投稿日期：2013 年 3 月 1 日；接受日期：2013 年 5 月 2 日。
[*] 通訊作者：pjann@ tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組講座研究員。台灣 台中市。
[4] 國立中興大學植物病理系教授。台灣 台中市。
[5] 農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。

酵素分泌的反應情形，因此配合 Chang *et al.* (1992) 開發的薄膜法，將薄膜鋪在培養基上，阻隔病菌菌絲直接生長入培養基內，檢測時再將薄膜連同菌絲移除，以利酵素反應的判讀。本文即報告利用薄膜法測定不同褐根病菌株在固態培養基上分泌細胞外泌酵素的情形。

## 材料與方法

### 供試菌株

選取 5 個分離自不同寄主與不同地點的褐根病菌株供試，包括分離自南投縣國姓鄉木麻黃之菌株 PN22.1、南投縣水里鄉葡萄之菌株 PNG1.1、南投縣中興新村櫸木之菌株 PN18.1、高雄市甲仙區梅樹之菌株 PNP1.1 及高雄市阿蓮區印度棗之菌株 PNZ1.1。

### 菌株分泌生體外酵素的測定

參考並稍微修改 Hankin & Anagnostakis (1975, 1977) 開發的方法，測定供試菌株在固體培養基上分泌生體外酵素的能力。測試前，各菌株分別移植於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, potato 200 g, dextrose 20 g, agar 15 g, $H_2O$ 1 L, PDA)，置於 24℃之定溫箱中無光照培養 5 d 之後，在菌落邊緣切下 5 mm × 5 mm 菌絲塊，移植於覆蓋一層聚碳酸酯膜 (polycarbonate membrane; 0.2 μm in pore diameter and 90 mm in disc diameter; Nuclepore Co., Pleasanton, CA, USA) (Chang *et al.* 1992) 的各種測試培養基中央培養，以分析不同菌株分泌各種不同生體外酵素之能力。測試每一種酵素時，各供試菌株各接種 4 個培養皿，試驗重複一次，試驗結果並經過統計分析，比較分泌酵素能力的差異性是否顯著。各種分解酵素的測定方法分述如下。

**澱粉分解酵素** (amylase; Hankin & Anagnostakis 1975)：以營養瓊脂 (nutrient agar; NA) (Difico Co. USA) (Schaad 1980) 爲基礎培養基，加入 0.2% 可溶性澱粉 (soluble starch) (Sigma, USA) 爲基質 (substrate)，以 1 N HCl 將酸鹼值調爲 pH 6.0，經高溫高壓殺菌釜滅菌後製成平板 (9 cm diam.)，每皿約含 20 mL 培養基。俟培養基凝固後，再將一層滅菌後之聚碳酸酯膜平鋪於平板上，接種培養 5 d 的褐根病菌菌絲塊 (0.5 cm diam.)，於 24℃無光照定溫箱中培養 4–5 d。爾後，將聚碳酸酯膜連同菌絲取出，以 1% 碘液 (iodine solution) 約20 mL 爲染劑 (test reagent) 浸潤測試平板，對照平板呈藍紫色，而具有澱粉分解酵素的部位，會有澄清區出現，測量澄清環直徑，並以無接種褐根病菌者爲對照處理。無反應之培養基爲藍紫色或暗褐色。

**纖維分解酵素** (cellulose; Hankin & Anagnostakis 1977)：配製 CMC 培養基，以添加礦物鹽液 (mineral salt solution) 的酵母抽出培養基 (yeast extract agar) 爲基礎培養基 [ 每公升含 1 g yeast extract (Difico, USA)、500 mL 礦物鹽液及 15 g Bacto agar；礦物鹽液的濃度爲每公升含 2 g $(NH_4)_2SO_4$、4 g $KH_2PO_4$、6 g $Na_2HPO_4$、0.2 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、1 g $CaCl_2$、10 μg $H_3BO_3$、10 μg $MnSO_4$、70 μg $ZnSO_4$、50 μg $CuSO_4$ 及 10 μg $MoO_3$]，以 0.5% carboxymethylcellulose (Sigma, USA) 爲基質，滅菌前並以 1 N HCl 調整酸鹼值爲 pH 5.0。滅菌後製成平板，再將聚碳酸酯膜覆蓋平板上，接種褐根病菌菌絲塊，於 24℃無光照定溫箱中培養 4–5 d。取出聚碳酸酯膜後，以 0.4% 剛果紅 (congo red) 溶液爲測試染劑，每一培養皿倒入 20 mL 浸潤 10 s 後倒掉，靜置 15 min 後以清水潤洗，測量黃色澄清環大小，並以無接種褐根病菌者爲對照處理。無反應者爲淡紅色，但無淡黃色透明澄清環。

**果膠分解酵素** (pectinases, pectolytic enzymes; Hankin & Anagnostakis 1975)：以添加礦物鹽液的酵母抽出培養基 (yeast extract agar) 爲基礎培養基 (同纖維分解酵素之基礎培養基)，加入 5 g pectin (Sigma, USA) 爲基質，滅菌前以 1 N HCl 將酸鹼值調爲 pH 5.0，以測試 polygalacturonase (PG)，或以 1 N NaOH 將酸鹼值調爲 pH 7.0，以測試 pectate transeliminase (PTE) (pectate lyase)。培養基滅菌後

製成平板，將聚碳酸酯膜覆蓋於平板上後，接種褐根病菌，於24℃無光照定溫箱中培養4–5 d後，將聚碳酸酯膜取出，以1%十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyltrimethyl ammonium bromide, Acros Organics) 水溶液爲測試劑，浸潤測試平板，觀察去除薄膜之平板上是否有澄清環出現。測量澄清環大小，並以無接種褐根病菌者爲對照處理。無反應者無透明澄清環。

**蛋白分解酵素** (protease; Hankin & Anagnostakis 1975)**：**以NA爲基礎培養基，白明膠 (gelatin, Merck, Germany) 爲基質，將0.4% gelatin加入NA中，以1 N HCl將酸鹼值調爲pH 6.0，經殺菌釜滅菌後製成平板，將聚碳酸酯膜覆蓋於平板上後，接種褐根病菌，於24℃無光照定溫箱中培養4 d後，將聚碳酸酯膜取出。以硫酸銨 (ammonium sulfate) 之飽和水溶液爲測試劑，浸潤測試平板，具有蛋白分解酵素者，去除薄膜之平板上會出現透明澄清環。測量澄清環大小，並以無接種褐根病菌者爲對照處理。無反應者爲白色，無澄清環。

**磷酸分解酵素** (phosphatase; Hankin & Anagnostakis 1975)**：**配製PhTM培養基，以2.35% Plate Count Agar (PCA, Difco, USA) 爲基礎培養基，滅菌前，以1 N HCl調至酸鹼值爲pH 6.0，滅菌後每980 mL培養基加入20 mL之0.01 M PhT [$\alpha$-Nitrophenyl phosphate disodium (Sigma, USA)] 溶液爲基質。固態平板製做後，將聚碳酸酯膜覆蓋平板上，接種褐根病菌菌絲塊，於24℃無光照定溫箱中培養4 d。取出聚碳酸酯膜後，以28% $NH_4OH$ (氨水) 爲測試染劑，倒入培養皿內，產生酵素的部份，呈現桃紅色。測量桃紅色暈圈大小，並以無接種褐根病菌爲對照處理。無酵素產生者無呈色反應。

**尿素分解酵素** (urease; Hankin & Anagnostakis 1975)**：**以2.35% PCA爲基礎培養基，1%尿素 (urea) 爲基質。滅菌前之PC以1 N HCl將酸鹼值調爲pH 6.0，滅菌後加入經過0.22 μm孔徑過濾膜消毒之50% (w/v) 尿素 (Sigma, USA)，使最終濃度爲1%，之後製成平板。再將聚碳酸酯膜覆蓋其上後，接種褐根病菌，於24℃無光照定溫箱中培養5 d後，將聚碳酸酯膜取出，每皿加入10 mL尚未凝固的1%普魯氏藍 (bromothymol blue) 偵測液覆蓋測試平板。普魯氏藍液之配製爲100 mL之磷酸緩衝溶液 (phosphate buffer, 0.01 M, pH 6.0) 中含有1 g尿素、0.5 mL 1% bromothymol blue及1.5 g瓊脂粉，以1 N HCl將酸鹼值調pH 6.0。偵測溶液凝固後呈橘黃色，靜置2 h後，觀察偵測層是否有變色，如有尿素分解酵素產生會形成藍綠色至深藍紫色暈環，無酵素者之顏色仍爲橘黃色。測量藍紫色反應環大小，並以無接種褐根病菌者爲對照處理。

**脂質分解酵素** (lipase; Hankin & Anagnostakis 1975)**：**以蛋白凍瓊脂 (peptone agar) 爲基礎培養基，Tween 20爲基質。每公升PCA含有10 g peptone (Difco, USA)、5 g NaCl、0.1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 及20 g瓊脂粉，滅菌前以1 N HCl將酸鹼值調爲pH 6.0，經高溫高壓滅菌後，等培養基降溫至45–50℃時，加入1%之Tween 20 (經高溫高壓滅菌)，然後製成平板。再將聚碳酸酯膜覆蓋其上，接種褐根病菌，於24℃無光照定溫箱中培養7 d後，將聚碳酸酯膜取出，直接觀察去除薄膜之平板上是否有白色沉澱物產生。測量白色沉澱環大小，並以無接種褐根病菌者爲對照處理。

**磷脂分解酵素** (phosphatidase)**：**以大豆卵磷脂 (soybean lecithin，台灣台糖公司) 爲基質，配製大豆卵磷脂培養基。先將1 g大豆卵磷脂溶於100 mL蒸餾水中，置於冰箱內過夜，使其完全乳化；或以打碎機 (Waring blender, New Hartford, Conn., USA) 經4,500 rpm打碎1 min後備用。將1%卵磷脂溶於0.05 M磷酸緩衝液 (pH 5.4) 中，添加0.04%硫酸鎂 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 及2%瓊脂粉，滅菌後製成平板，將聚碳酸酯膜覆蓋於平板上，接種褐根病菌，於24℃無光照定溫箱中培養5 d後，將聚碳酸酯薄膜取出，觀察去除薄膜

之平板上是否有白色沈澱環形成。測量白色沈澱環大小，並以無接種褐根病菌者為對照處理。

**幾丁質分解酵素** (chitinase; Hankin & Anagnostakis 1975)：以幾丁質 (chitin) 為基質，將 20 g 粗幾丁質 (crude chitin, Sigma, USA) 浸泡於 100 mL 之 50% 硫酸 (hydrogen sulfate) 溶液中約 24 h，不斷攪拌，當幾丁質呈褐色濃稠狀時，倒入 1 L 容器內，加滿蒸餾水，待幾丁質沉澱後，倒掉上層雜質，再加入蒸餾水重覆洗滌數次，直到幾丁質呈乳白色懸浮狀，酸鹼值為中性時為止。再以網篩 (60 mesh) 過濾 3–4 次後，加入礦物鹽與瓊脂粉，製作幾丁質培養基，並以 1 N NaOH 將酸鹼值調為 pH 8.0 後滅菌。每公升幾丁質培養基含有純化過幾丁質 (相當於 20 g 粗幾丁質)、0.7 g $K_2HPO_4$、0.5 g $KH_2PO_4$、0.5 g $MgSO_4$、0.01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、0.001 g $ZnSO_4$、15 g 瓊脂粉。滅菌後的幾丁質培養基製成平板後，將聚碳酸酯膜覆蓋其上，接種褐根病菌，於 24℃無光照定溫箱中培養 4 d 後，將聚碳酸酯膜取出，觀察去除薄膜之平板上是否有澄清環出現。測量澄清環大小，並以無接種褐根病菌者為對照處理。

**木質分解酵素** (laccase, p-diphenol oxidase; Niku-Paavola & Raaska 1990)：以酵母麥芽抽出培養基 (yeast extract-malt extract agar; YMEA) 為基礎培養基，每公升含 20 g 麥芽抽出物 (malt extract) (Difico, USA)、1 g 酵母抽出物 (yeast extract)、15 g 洋菜粉。YMEA 培養基經高溫高壓殺菌釜消毒後，在培養基約為 45–50℃時，每皿加入 10 g 木屑麥麩基質 [80% 鋸木屑 (saw dust)、20% 麥麩 (wheat bran)，含水量 65–70%，先以 100℃ 滅菌 1.5 h]，稱為 S-YMEA 培養基，然後製成平板。將聚碳酸酯膜平鋪於平板上後，接種褐根病菌，於 24℃定溫箱中培養 7 d 後，將聚碳酸酯膜取出，再以濃度 11,000 ppm ABTS [2, 2’-azino-di (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), Sigma, USA] 測試劑浸潤染色，並佈滿培養皿表面，染色 10 min 後觀察菌落是否變為藍綠色。調查方法分為 4 個等級，0 級：無變色 (無產生分解酵素)；1 級：僅培養皿中央變色；2 級：至菌落外緣變色；3 級；培養皿全部變色。並以無接種褐根病菌者為對照處理。

### 統計分析方法

所有分泌酵素之活性測試結果先進行變方分析 (ANOVA)，再以最小顯著差異性 (Fisher’s least significant difference; LSD) 測驗，分析各處理在 5% 顯著下之差異。

## 結果

### 澱粉分解酵素

經測試供試之 5 個褐根病菌株在培養 4 d 後，其去除薄膜的培養基經碘液染色後均出現明顯的澄清環 (圖 1A)，顯示各菌株皆能分泌大量的澱粉分解酵素，但以南投中興櫸木菌株 (PN18.1) 形成的澄清環最大，平均直徑達 4.85 cm，而以高雄阿蓮印度棗菌株 (PNZ1.1) 形成的澄清環最小，平均直徑僅 3.43 cm，兩者達 5% 顯著性差異。其他菌株形成之澄清環介於兩者之間，均未達顯著性差異 (表 1)。

### 纖維素分解酵素

經測試供試之 5 個褐根病菌株皆能分泌纖維分解酵素 (圖 1B)，其中以南投水里葡萄菌株 (PNG1.1) 及高雄甲仙梅樹菌株 (PNP1.1) 分泌的酵素活性較強，經剛果紅測試後之澄清環直徑在 8 cm 以上，而其他三菌株南投中興櫸木菌株 (PN18.1)、南投國姓木麻黃 (PN22.1) 及高雄阿蓮印度棗菌株 (PNZ1.1) 分泌的酵素活性相對較低，澄清環直徑在 6 cm 以下，兩類菌分泌纖維分解酵素的差異達 5% 顯著性差異 (表 1)。

### 果膠分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株在果膠酵素基質培養基生長後，經十六烷基三甲基溴化銨測試劑反應後均會出現明顯的澄清環 (圖 1C)，證實供試菌株皆能分泌兩種果膠分解酵素，但菌株間分泌酵素的能力則有顯著性差異。

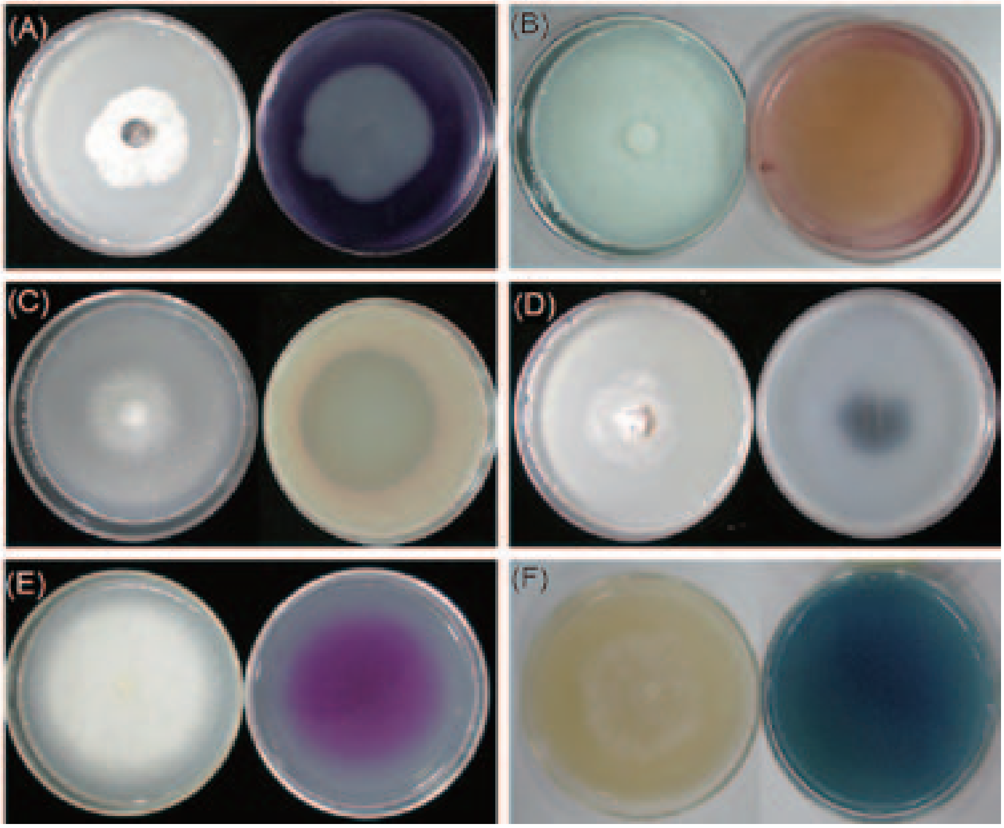


**圖 1.**　褐根病菌在覆蓋聚碳酸酯膜之固態基質培養基上產生細胞外泌酵素之檢測情形。(A) 澱粉分解酵素；(B) 纖維素分解酵素；(C) 果膠分解酵素；(D) 蛋白質分解酵素；(E) 磷酸分解酵素；及 (F) 尿素分解酵素。圖左爲褐根病菌在酵素基質培養基上於 24℃生長 4–5 d 之情形，圖右爲移除聚碳酸酯薄膜後測試酵素活性之情形。

**Fig. 1.**　*In vitro* detection of extracellular enzymes (A–F) secreted by *Phellinus noxius*. on solid agar. *P. noxius* was inoculated on a polycarbonate membrane which was placed on solid agar media amended with specific enzyme-reaction substrate in each Petri dish and the cultures were incubated at 24℃ for 4–5 days (A–F, left dish), and appearance of enzyme activity (A–F, right dish) after removal of membrane and fungus and stained the media with test reagents. (A) Amylase; (B) Cellulose; (C) Pectinase; (D) Protease; (E) Phosphatase; and (F) Urease.

在 polygalacturonase (PG) 部分，以南投中興新村櫸木分離之菌株 (PN18.1) 活性最強，澄清環直徑達 5.75 cm；其他菌株分泌酵素的能力相對較弱，澄清環直徑在 2.45–3.55 cm 之間，兩者達 5% 顯著性差異 (表 1)。而在 pectate transeliminase (PTE) 方面，亦以南投中興新村櫸木菌株 (PN18.1) 的活性最強，澄清環直徑達 5.63 cm；高雄阿蓮印度棗分離之菌株 (PNZ1.1) 活性最弱，澄清環直徑僅 1.13 cm，兩者達 5% 顯著性差異；其他菌株的酵素活性則居於兩者中間，但與兩者亦達 5% 顯著性差異 (表 1)。

## 蛋白質分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株在酵素基質培養基生長後，去除薄膜與菌絲，倒入硫酸銨溶液測試，均能形成澄清環 (圖 1D)，顯示供試菌株皆能分泌蛋白分解酵素，其中以南投國姓木麻黃菌株 (PN22.1) 活性相對較強，澄清環直徑達 4.1 cm，比其餘四菌株的酵素活性顯著 (5%) 爲強，其餘四菌株形成的澄清環直徑均在 2.7 cm 以下，四菌株間無顯著性差異 (表 1)。

**表 1.** 不同褐根病菌菌株在固態培養基上分泌各種細胞外泌酵素之測定。

**Table 1.** Production of extracellular enzymes from five isolates of *Phellinus noxius* collected from different hosts at different locations in Taiwan.[z]

| Isolate no. | Host | Location | Diameter of reaction zone (cm) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Amylase | Cellulase | Polygalac-turonase | Pectate transelimi-nase | Protease | Phospha-tase | Urease | Lipase | Phospha-tidase | Chitinase | Laccase[y] |
| PN22.1 | *Casuarina equisetifolia* (ironwood tree) | Guosing, Nantou | 4.08 ab[x] | 4.50 b | 2.60 b | 4.05 b | 4.10 a | 5.00 a | 8.50 a | 4.83 a | 0 | 0 | 3 |
| PNG1.1 | *Vitis vinifera* (grape) | Shueili, Nantou | 4.10 ab | 8.20 a | 3.55 b | 2.95 b | 2.68 b | 4.20 a | 6.80 a | 4.80 a | 0 | 0 | 3 |
| PN18.1 | *Zelkova serrata* var. *Serrat* (zelkova) | Chungsin, Nantou | 4.85 a | 5.90 b | 5.75 a | 5.63 a | 1.93 b | 2.94 b | 2.84 b | 3.93 a | 0 | 0 | 3 |
| PNP1.1 | *Prunus mume* (plum) | Jiasian, Kaohsiung | 3.93 ab | 8.10 a | 2.70 b | 3.43 b | 2.20 b | 2.80 b | 2.10 b | 2.13 b | 0 | 0 | 3 |
| PNZ1.1 | *Zizyphus mauritiana* (Indian Jujube) | Alian, Kaohsiung | 3.43 b | 4.18 b | 2.45 b | 1.13 c | 2.23 b | 5.20 a | 1.97 b | 3.43 ab | 0 | 0 | 3 |

[z] Isolates of *P. noxius* were cultured on various solid media amended with respective enzyme-producing substrates at 24℃ for 4–5 days.
[y] Activity of laccase, 0: no green-blue zone; 1: green-blue zone < 1 cm diam.; 2: green-blue zone = colony diam.; 3: green-blue zone up to the edge of Petri dish.
[x] Means followed by the same letters within the same column were not significantly different at $P \geq 0.05$ level according to LSD (least significant difference) test.

### 磷酸分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株皆能分泌磷酸脂分解酵素，惟分解酵素的能力有顯著之強弱差異。供試菌株在測試酵素基質培養基生長後，去除聚碳酸酯膜後，再以氨水染色，均可產生桃紅色暈圈 (圖 1E)，其中以阿連印度棗菌株 (PNZ1.1)、國姓木麻黃菌株 (PN22.1) 及水里葡萄菌株 (PNG1.1) 分泌的酵素活性較強，桃紅色暈圈的直徑均在 4.0 cm 以上，該三菌株間無顯著性差異，但比其餘兩菌株的酵素活性顯著為強 (表 1)。其餘兩菌株的酵素活性較差，桃紅色暈圈直徑在 3.0 cm 以下，但兩者間無顯著性差異。

### 尿素分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株在酵素基質培養基生長後，去除薄膜的培養基，再倒入尚未凝固的普魯氏藍偵測液覆蓋培養基，均會形成藍綠色 (圖 1F)，顯示供試菌株皆能分泌尿素分解酵素，其中以南投國姓木麻黃菌株 (PN22.1) 活性最強，藍綠圈直徑達 8.5 cm，覆蓋整個培養基；水里葡萄菌株 (PNG1.1) 次之，藍綠圈直徑達 6.8 cm，比其餘三個菌株的酵素活性顯著為強，且達顯著性差異 (5%) (表 1)。其餘三菌株的反應圈直徑均在 3.0 cm 以下，彼此間未達顯著性差異。

### 脂質分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株皆能分泌脂質分解酵素，在酵素基質培養基上產生明顯的白色沈澱圈 (圖 2)。依形成白色沈澱圈大小排序，依序為國姓木麻黃菌株 (PN22.1) (直徑 4.83 cm)、水里葡萄菌株 (PNG1.1) (直徑 4.8 cm)、中興欅木菌株 (PN18.1) (直徑 3.93 cm)、阿連印度棗菌株 (PNZ1.1) (直徑 3.43 cm) 及甲仙梅子菌株 (PNP1.1) (直徑 2.13 cm)，依據統計分析，前三菌株與最後一菌株形成的白色沈澱圈大小達 5% 顯著性差異，但前四菌株間無顯著性差異，而後兩菌株間亦無差異 (表 1)。

### 磷脂分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株培養在供試固態基質培養基上，皆未檢測出細胞外泌磷脂分解酵素之活性。

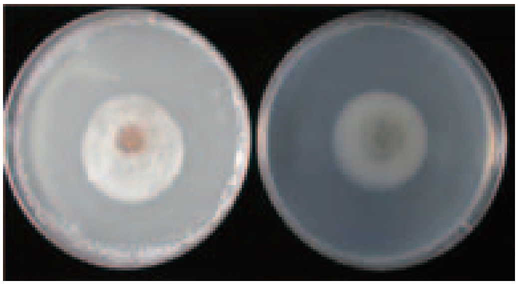

**圖 2.** 褐根病菌在覆蓋聚碳酸酯膜之固態培養基上產生細胞外脂質分解酵素之情形。圖左為褐根病菌在酵素基質培養基上於 24℃ 生長 7 d 之情形，圖右為移除聚碳酸質薄膜後之酵素呈現情形。

**Fig. 2.** Production of lipase by *Phellinus noxius* on solid agar medium *in vitro*. Note colony morphology (left dish) of *P. noxius* grown at 24 ℃ for 7 d on polycarbonate membrane which was placed on peptone agar amended with Tween 20 and the appearance of lipase activity (right dish) after removal of membrane and fungal culture.

### 幾丁質分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株培養在供試固態基質培養基上，皆未檢測出細胞外泌幾丁質水解酵素之活性。

### 木質分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株在 S-YMEA 酵素基質培養基生長後，去除薄膜的培養基，再倒入 ABTS 染劑浸潤染色，整個培養基均呈深藍綠色 (圖 3)，顯示供試菌株皆能分泌 laccase，且分泌酵素的能力相同，級數均為最高級 3 (表 1)。

## 討論

酵素在生物的生活行為中扮演重要的角色，尤其在病原微生物方面，它不但是分解與利用食物的利器，也是攻擊與入侵寄主的重要工具之一。有關植物病原酵素的研究報告非常多，而可供用於酵素檢測的方法多達十數種，其中 Hankin & Anagnostakis (1975, 1977) 開發的酵素固體培養基檢測方法，可以

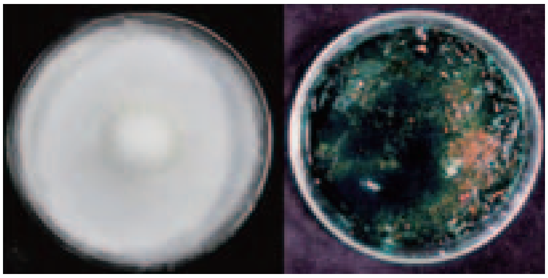

**圖 3.** 褐根病菌在覆蓋聚碳酸酯膜之 S-YMEA 固態培養基上產生細胞外泌 laccase (一種木質分解酵素) 之檢測情形。圖左爲褐根病菌在酵素基質培養基上於 24℃生長 7 d 之情形，圖右爲移除聚碳酸質薄膜後經 ABTS 染色之情形。

**Fig. 3.** Detection of laccase secreted by *Phellinus noxius* on solid agar medium *in vitro*. Note colony morphology (left dish) of *P. noxius* grown at 24 ℃ for 7 d on polycarbonate membrane which was placed on yeast extract-malt extract agar amended with wheat bran plus saw dust substrate (S-YMEA) and the appearance of laccase activity (right dish) after removal of membrane and fungal culture and stained the media with ABTS solution.

快速且簡便的檢測真菌與多種微生物產生的多種細胞外泌酵素 (extracellular enzymes) 的能力，包括 amylase、cellulase、pectinases (PG 與 PTE)、protease、phosphatase、urease 及 chitinase 等。在本試驗中，利用該等方法，也可以檢測褐根病菌產生多種細胞外泌酵素的能力。惟褐根病菌的菌絲在固體培養基上生長密實，且產生深褐色色素，嚴重阻礙酵素反應的觀察與判讀，因此配合 Chang *et al.* (1992) 開發的改良方法，在基質培養基上鋪上一層聚碳酸酯薄膜，再接種菌絲塊。由於薄膜的孔徑只有 0.2 μm，可以阻隔褐根病菌菌絲長入培養基中，但不會阻隔病菌分泌的細胞外泌酵素滲入培養基中 (因酵素的分子量相對較小，可以通過薄膜的小孔)。當進行酵素反應前，只要將薄膜移除，再將酵素反應偵測液加入浸潤基質培養基，即可清晰的判讀多種酵素的分泌情形；而 lipase 的判讀無需另加測試劑，在薄膜移除後即可清晰的觀察與判讀是否有白色沈澱物的形成。利用上述改良的酵素測定方法，證實本試驗供試之 5 株褐根病菌在固態培養基上均可以分泌 8 種細胞外分解酵素，包括 amylase、cellulase、pectinases (PG 與 PTE)、protease、phosphatase、urease 及 lipase，但都不能分泌 phosphatidase 與 chitinase (表 1)，顯示 5 株代表性供試菌株雖然分離自不同地點與不同寄主，但能分泌或不能分泌某些特定酵素 (本試驗測定之 10 種生體外酵素) 的特性均具有相當的一致性，不受地域與寄主種類的影響。然而，5 株供試菌株雖然均可以分泌上述 8 種細胞外泌酵素，但分泌酵素的能力在菌株間卻有強弱的差異，且經常達 5% 顯著性差異水準，且分泌不同酵素能力的強弱差異在菌株間亦不盡相同 (表 1)，例如南投中興櫸木菌株 PN18.1 分泌 amylase 與 pectinases (PG 與 PTE) 的能力較強，南投國姓木麻黃菌株 PN22.1 分泌 protease、phosphatase、lipase 及 urease 的能力較強，南投水里葡萄菌株 PNG1.1 分泌 cellulase 與 lipase 的能力較強，而高雄甲仙梅樹菌株 PNP1.1 與高雄阿蓮印度棗菌株 PNZ1.1 分別分泌 cellulase 與 phosphatase 的能力較強。至於影響菌株間分泌酵素能力差異的原因是否與遺傳或其他因子有關，則尚需進一步探討。

爲害樹木，造成木材腐朽的擔子菌 (wood decay fungi) 可以分成兩大類，包括白腐菌 (white rot fungi) 與褐腐菌 (brown rot fungi)，主要的區別爲前者除可分解細胞壁的纖維質 (cellulose) 與半纖質 (semicellulose) 外，而且還能分解木質素 (lignin) (Kirk & Kelman 1965; Blanchette1991)。Laccase 爲木質分解酵素 (ligninase) 的一種，在病菌侵入寄主分解木材組織上扮演重要的角色，此種 laccase 酵素只有能分泌木質素分解酵素之真菌才會產生 (Intini 1991; Tuora *et al.* 1995)。在 1980 年代，Geiger *et al.* (1985, 1986a) 從事爲害橡膠 (*Hevea brasiliensis*) 造成根部腐朽的病原菌 [*Rigidoporus lignosus* 與褐根病菌 (*P. noxius*)] 的病原酵素研究，發現褐根病菌可以分泌 laccase，導致木材腐朽，因此認爲該菌應該歸屬爲白腐病菌。在本試驗中，改良 Niku-Paavola & Raaska (1990) 開發的 laccase 固態培養基快速檢測法，亦證實存在台灣的褐根病菌菌株亦可分泌 laccase，分解添加在培養基中鋸木

屑的木質素，而且供試菌株分泌 laccase 的能力均很強，達到最高級數 3，且菌株間之間並無顯差異 (表 1)。在試驗的同時，以一株為害番椒的疫病菌 (*Phytophthora capsici*) 爲對照組，結果發現反應後的培養基並無變色，顯示疫病菌菌株不會產生 laccase，並非白腐病菌 (資料未顯示 )。

除 laccase 外，褐根病菌分泌其他酵素的研究並不多，Geiger *et al.* (1985, 1986b) 報告爲害橡膠的褐根病菌可分泌 phosphatase、peroxydase 及數種分解多糖類的酵素，包括 carboxymethyl (CM)-cellulase, pectinases, β-glucosidase, α- & β-galactosidase, xylanase及laminarinase等。利用固態培養基快速檢測法，本報告則發現台灣的褐根病菌除可分泌 cellulase、pectinases (PG & PTE) 及 phosphatase 之外，更可分泌 amylase、protease 及 urease，但都不能分泌 phosphatidase 與 chitinase (表 1)。

*Phellinus noxius* 爲台灣果樹、林木的重要根部病原菌，寄主範圍十分廣泛，受害作物不下百餘種，爲台灣木本植物的頭號殺手 (Ann *et al.* 2002; Tsai 2008)。先前的試驗報告均指出褐根病菌的致病力甚強，一年生枇杷在接種半年後，即會有 50% 的植株死亡 (Tsai 2008)；而接種褐根病菌的枇杷莖部片段 ( 直徑 1–1.5 cm)，在接種三個月後即會完全腐朽，供做接種原使用 (Tsai 2008)。本試驗發現台灣褐根病菌分泌 laccase 的能力非常強，這是否與褐根病菌在台灣大肆爲害有關，尚需進一步探討。

## 引用文獻


Ann, P. J., H. L. Lee, and J. N. Tsai. 1999a. Survey of brown root disease of fruit and ornamental trees caused by *Phellinus noxius* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 8:51–60. (in Chinese with English abstract)

Ann, P. J., H. L. Lee, and T. C. Huang. 1999b. Brown root rot of ten fruit trees caused by *Phellinus noxius* in Taiwan. Plant Dis. 83:746–750.

Ann, P. J., T. T. Chang, and W. H. Ko. 2002. *Phellinus noxius* brown root rot of fruit and ornamental trees in Taiwan. Plant Dis. 86:820–826.

Ann, P. J. and W. H. Ko. 1992. Decline of longan trees: Association with brown root rot caused by *Phellinus noxius*. Plant Pathol. Bull. 1:19–25.

Chang, T. T. 1992. Decline of some forest trees associated with brown root rot caused by *Phellinus noxius*. Plant Pathol. Bull. 1:90–95.

Chang, T. T. 1995. Decline of nine tree species associated with brown rot root caused by *Phellinus noxius* in Taiwan. Plant Dis. 79:962–965.

Chang, T. T., X. Y. Yang, and W. H. Ko. 1992. A sensitive method for detecting production of extracellular enzymes by fungi on solid media. Mycologia 84:923–926.

Cunningham, G. H. 1965. Polyporaceae in New Zealand. N. Z. Dept. Sci. Ind. Res. Bull. 164:1–304.

Geiger, J. P., M. Nicole, D. Nandris, and B. Rio. 1985. The aggression of *Hevea brasiliensis* by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*: Some biochemical events. Eur. J. For. Pathol. 15:316–319.

Geiger, J. P., B. Rio, D. Nandris, and M. Nicole. 1986a. Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. I. Purification and some physicochemical properties. Appl. Biochem. Biotechnol.12:121–134.

Geiger, J. P., B. Rio, D. Nandris, and M. Nicole. 1986b. Polysaccharide degrading enzymes excreted by two root rot fungi. Symbiosis 2:337–340.

Hankin, L. and S. L. Anagnostakis. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67:597–607.

Hankin, L. and S. L. Anagnostakis. 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect $c_x$ cellulase activity of microorganisms. J. Gen. Microbiol. 98:109–115

Intini, M. G. 1991. Some common species of tropical lignicolous fungi. Intl. J. Trop. Plant Dis. 9:1–14.

Kirk, T. K. and A. Kelman. 1965. Lignin degradation as related to the phenoloxidases of selected wood-destroying basidiomycetes. Phytopathology 55:739–745.

Niku-Paavola, M. L. and L. Raaska.1990. Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. Mycol. Res. 94:27–31.

Pegler, D. N. and J. M. Waterston. 1968. *Phellinus noxius* No. 195. *in*: Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonw. Mycol. Inst., Kew, London.

Sawada, K. 1928. Camphor tree decline. Descript. Catal. Formosan Fungi 4:86–91.

Schaad, N. W. 1980. Laboratory Guide for Identifica-

tion of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press. St. Paul. 72 pp.

Tsai, J. N. 2008. Biological Characteristics of *Phellinus noxius* and its Molecular Methods for Diagnosis. Doctoral Dissertation, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung. 135 pp. (in Chinese)

Tsu, S. T., T. C. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathol. Soc. Pub., Taichung. 386 pp. (in Chinese)

Tuora, U., K. Winterhalter, and A. Fiechter. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. J. Biotechnol. 41:1–17.

# Use of Polycarbonate Membrane for Detection of Extracellular Enzymes of *Phellinus noxius* on Solid Media

Jyh-Nong Tsai[1], Shou-Fong Cheng[2], Huei-Lin, Tsai[2], Hung-Chang Huang[3], Wen-Hsui Hsieh[4], and Pao-Jen Ann[5,*]

## Abstract

Tsai, J. N., S. F. Cheng, H. L. Tsai, H. C. Huang, W. H. Hsieh, and P. J. Ann. 2013. Use of polycarbonate membrane for detection of extracellular enzymes of *Phellinus noxius* on solid media. J. Taiwan Agric. Res. 62(2):184–194.

Brown root rot caused by *Phellinus noxius* is one of the most serious diseases associated with decline of fruit trees and ornamental woody trees in Taiwan. The objective of this study was to develop a modified polycarbonate membrane method for detection of extracellular enzymes produced by *P. noxius* growing on solid agar media. Five isolates of *P. noxius* collected from different host plants in Taiwan were used in this study, including isolate PN22.1 from ironwood (*Casuarina equisetifolia*) at Guosing, Nantou, isolate PNG1.1 from grapevine (*Vitis vinifera*) at Shueili, Nantou, isolate PN18.1 from zelkova (*Zelkova serrata* var. *serrat*) at Chungsin, Nantou, isolate PNP1.1 from plum (*Prunus mume*) at Jiasian, Kaohsiung and isolate PNZ1.1 from Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) at Alian, Kaohsiung. They were tested for production of extracellular enzymes by growing each isolate on polycarbonate membrane disc (0.2 μm in pore diam.) which was placed on PDA amended with enzyme-reaction chemicals for detection of enzymes. Results showed that eight extracelluar enzymes, including amylase, cellulase, pectinases (polygalacturonase and pectate transeliminase), protease, phosphatase, lipase and laccase, were detected in all the five isolates of *P. noxius*, but no phosphatidase and chitinase were detected from these isolates. Among the eight enzymes detected, the level of laccase secreation was high in all the five isolates, but the level of secretion of other seven enzymes varied with the isolates tested. The technique for detection of enzymes can be applied to pathogenecity analysis in *P. noxius* and other fungi.

**Key words:** Brown root rot, *Phellinus noxius*, Extracellular enzymes, Laccase, Polycarbonate membrane.

---

Received: March 1, 2013; Accepted: May 2, 2013.

* Corresponding author, e-mail: pjann@tari.gov.tw

1 Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

2 Research Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

3 Distinguished Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

4 Professor, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

5 Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

# Editorial Board

## Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
*Taiwan Agricultural Research Institute*

## Editors

Ann, Pao-Jen
*Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute*

Chen, Chi-Chung
*Department of Applied Economics, National Chung Hsing University*

Chen, Chien-Chung
*Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute*

Chen, Chiling
*Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute*

Chen, Chung-Li
*Department of Agronomy, National Chung Hsing University*

Chen, Fure-Chyi
*Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology*

Chen, Su-Ming
*Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University*

Chien, Li-Hsien
*Department of Applied Economics, National Chung Hsing University*

Guo, Horng-Yuh
*Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute*

Hou, Feng-Nan
*Department of Entomology, National Chung Hsing University*

Huang, Chao-Chia
*Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute*

Huang, Pung-Ling
*Department of Horticulture & Landscape Architecture, National Taiwan University*

Kao, Ching-Huei
*Department of Agronomy, National Taiwan University*

Ko, Wen-Hsiung
*Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University*

Lu, Hsiu-Ying
*Taiwan Agricultural Research Institute*

Ou, Shyi-Kuan
*Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute*

Shen, Yuan
*Department of Soil & Environmental Sciences, National Chung Hsing University*

Su, Jeng-De
*Department of Food Science, Tunghai University*

Tsay, Hsin-Sheng
*Graduate Institute of Biochemical Sci. & Technol., Chaoyang University of Technology*

Tsay, Jyh-Rong
*Taiwan Agricultural Research Institute*

Tseng, Menq-Jiau
*Department of Horticulture, National Chung Hsing University*

Wang, Chan-Sen
*Department of Agronomy, National Chung Hsing University*

Wu, Hung-Pan
*Institute of Plant & Microbial Biology, Academia Sinica*

## Editorial Assistants

Chen, Siang-Jiun
*Commission of R&D Strategy on Agric. Sci. & Technol., Taiwan Agricultural Research Institute*

Wu, Yi-Yan
*Technical Service Division, Taiwan Agricultural Research Institute*

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 62 No. 2 June 30, 2013

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture
Publisher Junne-Jih Chen
Editor-in-Chief Chwen-Ming Yang
Address No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission http://aspers.airiti.com/Aspers/webHome.aspx?jnliid=J0042

Press Airiti Press Inc.
Address 18F., No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel +886-2-2926-6006
E-mail press@airiti.com

Price NT$ 175 (per copy)
Distributor 1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC
GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207
2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC
Tel: +886-4-2226-0330

# 台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.62 No.2 2013


## Research Articles


93 Ectopic Expression of ζ-Carotene Desaturase Gene from *Oncidium* Gower Ramsey Alters Leaf Morphology and Increases Carotenoid Content in Transgenic Tobacco
*Wen-Li Lee and Fure-Chyi Chen*

106 Different Agro-Ecosystems Affect Population and Density of Weeds in Paddy-Paddy and Paddy-Upland Rotation Systems
*Chiao-Ling Hsiao, Chewn-Ming Yang, and Chia-Hsun Ho*

126 Recycling of Spent King Oyster Mushroom Substrate for Production of Mushrooms
*Mei-Hsing Chen, Wei-Sung Li, Kaun-Tzer Wu, Shiuan-Yuh Chien, and Yun-Sheng Lue*

137 Marker-Assisted Selection of Salt Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.)
*Su-Chen Kuo, Chieh-Wei Kuo, Yann-Rong Lin, and Yong-Pei Wu*

157 Studies on Physiological Responses of Anthurium Cut Flowers after Cold Storage
*Chao-Chia Huang, Huey-Suey Huang, and Chin-Yu Tsai*

165 Survey on the Insect and Mite Pests of Sweet Pepper Grown in Net House and Selection of Chemicals for Pest Control
*Hsiou-Hua Hao*

174 Storage Temperature Affects Quality of Fresh Tuberous Roots of Sweet Potato during Storage Period
*Hsin-Chen Li*

184 Use of Polycarbonate Membrane for Detection of Extracellular Enzymes of *Phellinus noxius* on Solid Media
*Jyh-Nong Tsai, Shou-Fong Cheng, Huei-Lin, Tsai, Hung-Chang Huang, Wen-Hsui Hsieh, and Pao-Jen Ann*



ISSN 0022-4847

9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture